BESTIMMUNG UND CHARAKTERISIERUNG DER LANGKETTIGEN ACYL-COENZYM A-VERBINDUNGEN IN SÄUGETIERLEBER UND HEFE

Alexander Olbrich

1979

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41535722_0070

BESTIMMUNG UND CHARAKTERISIERUNG DER LANGKETTIGEN ACYL-COENZYM A-VERBINDUNGEN IN SÄUGETIERLEBER UND HEFE

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
des
Fachbereichs Chemie und Pharmazie
der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt
von
Alexander Olbrich

München 1979

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

1. Berichterstatter: Prof.Dr.F.Lynen

2. Berichterstatter: Prof.Dr.G.Hartmann

Tag der mündlichen Prüfung: 30.Juli 1979

fyrir

elskuna mína

R e l l u

Die vorliegende Arbeit wurde von Januar 1974 bis April 1979 auf Anregung und unter Leitung von Herrn Professor Dr.F.Lynen am Institut für Biochemie der Universität München ausgeführt.

Herrn Professor Dr.F.Lynen danke ich herzlich für das Interesse und die Unterstützung, die er dieser Arbeit und mir persönlich jederzeit zuteil werden ließ.

Frau B.Dietl danke ich für ihre ausgezeichnete, zuverlässige und geschickte Mitarbeit seit Mai 1975.

Für wertvolle Diskussionen und zahlreiche Anregungen möchte ich Herrn Professor Dr.S.Numa, Herrn Professor Dr.K.Sandhoff und Herrn Dr.G.-B.Kresze danken. Herrn G.Krippahl danke ich für die Ausführung der manometrischen Messungen, Herrn E.Conzelmann für die Hilfe bei den gaschromatographischen Trennungen.

Der Bayerischen Begabtenförderung und der Max-Planck-Gesellschaft gilt mein Dank für zeitweilig gewährte Stipendien.

Ferner möchte ich allen Kolleginnen und Kollegen danken, die durch Diskussionen und praktische Hilfe diese Arbeit unterstützten.

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	Einleitung	1
1.1.	Regulation der Fettsäuresynthese in tierischem Gewebe	4
	a) Regulation der Acetyl-CoA-Carboxylase	4
	b) Regulation der Fettsäuresynthetase	5
2.	Coenzym A	12
2.1.	Allgemeines	12
2.1.1.	Einleitung	12
2.1.2.	Eigenschaften von CoA	12
	a) Nucleotideigenschaften	13
	b) Säureeigenschaften	13
	c) Mercaptaneigenschaften	13
2.1.3.	Notwendigkeit von kinetischem und stöchiometrischem Test	14
2.2.	Endwertmethode	16
2.2.1.	Vergleich verschiedener stöchiometrischer Methoden	16
2.2.2.	Prinzip, Eigenschaften, Störmöglichkeiten der Phosphotransacetylase-Methode	17
2.2.3.	Versuche zur Endwertmethode; Eigenschaften von CoA	18
2.3.	Kinetischer Test (Phosphotransacetylase/Citratsynthase/Malat-Dehydrogenase-Methode)	2o
2.3.1.	Vergleich verschiedener kinetischer Tests	2o
2.3.2.	Prinzip, Eigenschaften, Störmöglichkeiten der Phosphotransacetylase/Citratsynthase/Malat-Dehydrogenase-Methode	21
2.3.3.	Versuche zum kinetischen Test; Eigenschaften von CoA	22
2.3.4.	Störungen des kinetischen Tests	24
2.3.5.	Einführung der Eichung des kinetischen Tests mit internem Standard und Herleitung der Grenzbedingungen	28
2.3.6.	Vergleich zwischen der Auswertung des kinetischen Tests mit externem und mit internem Standard - Untersuchung des Einflusses verschiedener Hemmstoffe	36
	a) Hemmung durch E2 bei konstanter CoA-Konzentration	37
	b) Hemmung durch Natriumphosphat-Puffer bei konstanter CoA-Konzentration	37
	c) Eichkurven im ungehemmten und durch Natriumphosphat-Puffer gehemmten Test	41
2.4.	Kinetischer Test (Phosphotransacetylase/Arsenolyse/Hydroxamsäure-Methode)	43
2.4.1.	Prinzip der Phosphotransacetylase/Arsenolyse/Hydroxamsäure-Methode	43
2.4.2.	Versuche zur Hydroxamsäure-Methode; Eigenschaften von Acetylphosphat	44
2.4.3.	Optimierung der Phosphotransacetylase/Arsenolyse/Hydroxamsäure-Methode	46
2.5.	Nichtenzymatische Bestimmungsmethoden für CoA	5o
2.5.1.	Bestimmungen, die auf den Nucleotideigenschaften von CoA beruhen	5o

Seite

a) UV-Spektren 5o
b) Fluoreszenzquenching 5o
2.5.2. Bestimmungen, die auf den Thioleigenschaften von CoA beruhen 52
a) Nitroprussid-Reaktion 52
b) DTNB-Methode 52

2.6. Anhang: Grenzbedingungen für die Linearität des kinetischen Tests bei Eichung mit externem Standard 52

3. LCFA-CoA-Verbindungen 57

3.1. Allgemeines 57
3.1.1. Einleitung 57
3.1.2. Eigenschaften 57
a) Nucleotideigenschaften 57
b) Säureeigenschaften 58
c) Thiolestereigenschaften 58
d) Eigenschaften, die auf dem Fettsäureanteil beruhen 59

3.2. Bestimmungsmethoden ohne Spaltung der Thioesterbindung 59
3.2.1. Enzymatische Bestimmung 59
3.2.2. Spektroskopische Charakterisierung (IR, UV) 6o
3.2.3. Papier- und dünnschichtchromatographisches Verhalten 61

3.3. Bestimmungsmethoden mit Spaltung der Thioesterbindung 67
3.3.1. Alkalische Hydrolyse der Thioesterbindung mit anschließender enzymatischer Bestimmung des freigesetzten CoA 67
3.3.2. Enzymatische Hydrolyse der Thioesterbindung mit anschließender enzymatischer Bestimmung des freigesetzten CoA 72
3.3.3. Die Differenzspektrenmethode 75
a) Bezug zur Phosphotransacetylase-Endwertmethode 75
b) Simulierung der Differenzspektrenmethode mit N,S-Diacetylcysteamin und ATP 78
c) Anwendung der Differenzspektrenmethode auf die Bestimmung von LCFA-CoAs 79
d) Verseifungskurven 8o
3.3.4. Hydroxamsäure-Methode 85
3.3.5. Alkalische Hydrolyse der Thioesterbindung mit anschließender nichtenzymatischer Bestimmung des freigesetzten CoA 86
a) Verzögerte Nitroprussid-Reaktion 86
b) DTNB-Methode 87
3.3.6. Alkalische Hydrolyse der Thioesterbindung mit anschließender Bestimmung der freigesetzten Fettsäure 89
3.3.7. Vergleich der mit verschiedenen Methoden bestimmten Verseifungskurven 92

3.4. Synthese und Reinigung von LCFA-CoAs 94
3.4.1. Herstellung von LCFA-CoA-Verbindungen 94
3.4.2. Reinigung des synthetisch hergestellten PCoA mit Hilfe von Fällungs- und Ausschüttelverfahren 96
3.4.3. Reinigung des synthetisch hergestellten PCoA mit Hilfe dünnschicht- und säulenchromatographischer Verfahren 1oo

Seite

a) Papier- und Dünnschichtchromatographie 1oo
b) Übertragung der dünnschichtchromatographischen Eigenschaften auf die Säulenchromatographie 1o1
c) Elutionschromatographie auf Kieselgelsäulen 1o2
d) Reinigung mit Hilfe von Sephadex 1o3
e) Reinigung mit DEAE-Cellulose 1o4
f) Versuchte Reinigung mit Hilfe einer Glaswollesäule 1o5

3.5. Weitere Charakterisierung der LCFA-CoA-Verbindungen 1o7
3.5.1. Unterscheidung von S-Acyl-3'-Dephospho-CoA 1o7
3.5.2. Detergenseigenschaften 1o9
a) Hemmung von Enzymreaktionen 1o9
b) Bestimmung der kritischen Micellenkonzentration 11o
3.5.3. Bestimmung der Fettsäurereste in LCFA-CoA-Verbindungen 113

4. Bestimmung von CoA und LCFA-CoA-Verbindungen in biologischem Material 115
4.1. Allgemeines 115
4.1.1. Tötung der Versuchstiere und Aufarbeitung des biologischen Materials 115
4.1.2. Prinzip des Säureaufschlusses 116

4.2. Der Säureaufschluß 117
4.2.1. Aufschluß von Hefezellen 117
a) Aufschluß mit Hilfe von Ultraschall 118
b) Aufschluß mit dem Manton-Gaulin-Zellhomogenisator 119
c) Kombination der Aufschlüsse nach a) und b) 121
4.2.2. Verfolgung der einzelnen Schritte des Säureaufschlusses 122
4.2.3. Wiederfindung von CoA und PCoA im Säureaufschluß ohne Hefe 124
4.2.4. Wiederfindung von CoA und PCoA im Säureaufschluß mit Hefe 126
4.2.5. Ergebnisse des Säureaufschlusses von Hefe in Abhängigkeit von Menge und Art der zugesetzten Kationen und Anionen 128
a) Eichung mit externem Standard 128
b) Eichung mit internem Standard 13o

4.3. Der Gehalt von CoA-Verbindungen in Leber und Hefe und seine Veränderungen 13o
4.3.1. Der Gehalt von Leber an löslichem und unlöslichem CoA 13o
a) Normalwerte in Schweine- und Rattenleber 13o
b) Veränderungen des Gehalts der Rattenleber beim Fasten 132
4.3.2. Normalwerte von löslichem und unlöslichem CoA in Hefe 134
4.3.3. Veränderungen des Gehaltes von Hefe an CoA-Verbindungen bei Verarmung an Nahrungsstoffen 134
4.3.4. Veränderungen des Gehalts von Hefe an CoA-Verbindungen bei Inkubation mit verschiedenen Substraten 137
a) Inkubation der Hefe mit verschiedenen Substraten 137
b) Anreicherung der Hefe in wäßrigem Äthanol 139
4.3.5. Weitere Messungen im Zusammenhang mit der Inkubation von Hefe in wäßrigem Äthanol 141
a) Abnahme der Äthanolkonzentration während der Anreicherung 141

Seite

b) Die Atemgröße der Hefe in äthanolischer Lösung und das O_2/Äthanol-Molverhältnis 142

5. Extraktion, Reinigung und Charakterisierung der LCFA-CoA-Verbindungen aus biologischem Material 146

5.1. Extraktion der LCFA-CoA-Verbindungen aus biologischem Material 146
5.1.1. Einleitung 146
5.1.2. Extraktion von LCFA-CoA-Verbindungen 148
5.1.3. Mitextraktion von Verunreinigungen, insbesondere von Lipiden 149
a) Auffindung von LCFA-CoAs in Lipidextrakten 149
b) Lipide als Begleitstoffe 150

5.2. Reinigung der LCFA-CoA-Verbindungen aus Extrakten 151
5.2.1. Reinigung durch Fest-Flüssig-Verteilung 152
5.2.2. Reinigung durch Flüssig-Flüssig-Verteilung 158
5.2.3. Reinigung durch chromatographische Verfahren 160
a) Entfernung von Nichtlipiden mit Hilfe von Sephadex 162
b) Kieselgelchromatographie 163
c) Andere Verfahren 165
5.2.4. Reinigung auf enzymatischem Wege 167
5.2.5. Isolierung der LCFA-CoA-Fraktion 169

5.3. Charakterisierung der LCFA-CoA-Verbindungen aus biologischem Material 174
5.3.1. Ergebnisse und Vergleich mit Literaturwerten 174
a) Ergebnisse 174
b) Literaturangaben zur Fettsäurezusammensetzung 179
5.3.2. Diskussion der gefundenen Fettsäurezusammensetzung 183
a) Geradzahlige gesättigte Fettsäuren 183
b) Ungeradzahlige gesättigte Fettsäuren 184
c) Einfach ungesättigte Fettsäuren 184
d) Mehrfach ungesättigte Fettsäuren 185

6. Experimenteller Teil 188

6.1. Allgemeines 188
6.1.1. Verwendete Geräte 188
6.1.2. Materialien 189
6.1.3. Allgemeine analytische Methoden 190
a) Proteinbestimmung 190
b) Radioaktivitätsbestimmung 190
6.1.4. Dünnschichtchromatographie 193
a) Zusammenstellung der Laufmittelsysteme 193
b) Zusammenstellung der Sprühmittel 193

6.2. Versuchsbeschreibungen zu Kapitel 2. 193
6.2.1. Stöchiometrischer Test zur Gehaltsbestimmung von käuflichem CoA (Phosphotransacetylase-Methode) 194
6.2.2. Kinetischer Test zur CoA-Bestimmung in Aufschlußproben (Phosphotransacetylase/Citratsynthase/Malat-Dehydrogenase-Methode) 194
6.2.3. Acetylphosphatbestimmung nach der Hydroxamsäure-Methode 195
6.2.4. CoA-Bestimmung nach der Phosphotransacetylase/Arsenolyse/Hydroxamsäure-Methode 196
6.2.5. DTNB-Methode zur SH-Bestimmung 197

6.3. Versuchsbeschreibungen zu Kapitel 3. 197
6.3.1. Bestimmung von LCFA-CoAs durch alkalische Hydrolyse und anschließende enzymatische Bestimmung des freigesetzten CoA

		Seite
6.3.2.	Vorschriften zu Kapitel 3.3.2.	198
6.3.3.	Aufnahme von Differenzspektren	198
6.3.4.	Radiochemischer Test für 1-^{14}C-PCoA	199
6.3.5.	Synthese und Reinigung von LCFA-CoAs	199
6.3.6.	Bestimmung der CMC	2oo
6.3.7.	Gaschromatographie	2o1
	a) Derivatisierung	2o1
	b) Gaschromatographie	2o1
6.4.	Versuchsbeschreibungen zu Kapitel 4.	2o2
6.4.1.	Säureaufschluß von Hefe	2o2
	a) Weiterverarbeitung der Überstände	2o2
	b) Weiterverarbeitung des Rückstands	2o2
6.4.2.	Verarmung und Anreicherung von Hefe	2o3
	a) Verarmung	2o3
	b) Anreicherung	2o3
6.4.3.	Bestimmung von Äthanol mit Alkoholdehydrogenase	2o4
6.4.4.	Manometrische Messungen	2o4
	a) Bestimmung der Atemgröße	2o5
	b) Bestimmung des O_2/Äthanol-Molverhältnisses	2o5
6.5.	Versuchsbeschreibungen zu Kapitel 5.	2o6
6.5.1.	Extraktionsmethoden	2o6
6.5.2.	Verfolgung der Extraktion von LCFA-CoA-Verbindungen mit dem kinetischen Test (Phosphotransacetylase/ Citratsynthase/Malat-Dehydrogenase-Methode)	2o7
	a) In der Literatur beschriebene Extraktionsmittel	2o7
	b) Grundsätzliches zur Extraktion	2o7
	c) Vergleich der mit verschiedenen Extraktionsmitteln erhaltenen Extraktionsausbeuten	21o
	d) Aufstellung von Extraktionsbilanzen	215
6.5.3.	Verfolgung der Extraktion von LCFA-CoA-Verbindungen durch Zugabe von 1-^{14}C-PCoA	219
6.5.4.	Verfolgung der Extraktion freier Fettsäuren durch Zugabe von 1-^{14}C-Palmitinsäure	22o
6.5.5.	Extraktion von Verunreinigungen	223
	a) Extraktion von Trockenmasse	223
	b) Extraktion von Protein	226
	c) Extraktion von Phosphat	226
6.5.6.	Lipidzusammensetzungen	229
6.5.7.	Dünnschichtchromatographie von Lipiden	231
6.5.8.	Umsetzung von Phospholipiden mit Phospholipase C	235
7.	Zusammenfassung	236
8.	Literaturverzeichnis	238

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen:

ACC	Acetyl-Coenzym A-Carboxylase
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
AMP	Adenosin-5'-monophosphat
Ar	Aryl-
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BSA	Rinder-Serumalbumin
CAT	Carnitin-Acetyltransferase
Ci	Curie
CMC	kritische Micellenkonzentration
CoA,CoASH	Coenzym A
CP	Cholinplasmalogen
DEAE	Diäthylaminoäthyl-
DG	Diglycerid
DPG	Diphosphatidylglycerin, Cardiolipin
dpm	wirkliche Zerfälle pro min
DTE	Dithioerythrit
DTNB	5,5'-Dithio-bis-(2-nitro-benzoesäure)
DTT	Dithiothreit
E	Extinktion
E2	Pyridin:Isopropanol:Wasser = 1:1:2
EP	Äthanolaminplasmalogen
FAS	Fettsäuresynthetase
FFA	Freie Fettsäuren
FLP	Folch-Unterphase
FMN	Flavin-Mononucleotid
FPP	French-Press-Pulver
FUP	Folch-Oberphase
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie
HPTLC	Hochauflösungsdünnschichtchromatographie
Ipm	gezählte Zerfälle pro min
K_i	Inhibitorkonstante
LCFA-CoA	langkettige Acyl-Coenzym A-Verbindungen
LP	Unterphase
LPA	Lysophosphatidsäure
LPC	Lysophosphatidylcholin, Lysolecithin
LPE	Lysophosphatidyläthanolamin
LPI	Lysophosphatidylinosit

LPS	Lysophosphatidylserin
MG	Molekulargewicht
NAD^+,NADH	oxidiertes, reduziertes Nicotinamiddinucleotid
$NADP^+$,NADPH	oxidiertes, reduziertes Nicotinamiddinucleotidphosphat
NG	Naßgewicht
PA	Phosphatidsäure
PC	Phosphatidylcholin, Lecithin
PCoA	Palmityl-Coenzym A
PE	Phosphatidyläthanolamin
PG	Phosphatidylglycerin
PI	Phosphatidylinosit
P_i	anorganisches Phosphat
POPOP	1,4-Bis-2-(5-phenyloxazolyl)-benzol
PP_i	anorganisches Pyrophosphat
PPO	2,5-Diphenyloxazol
PS	Phosphatidylserin
PTA	Phosphotransacetylase
R_T	Retentionszeit
S	Svedberg
SM	Sphingomyelin
sn	stereospezifische Numerierung
t	Zeit
TCA	Trichloressigsäure
TG	Trockengewicht; Triglycerid
TLC	Dünnschichtchromatographie
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Enzymeinheit
U/min	Umdrehungen pro min
UP	Oberphase
V, v	Volumen
v/v	Volumen-%
w/v	Gewichts-%
ε	molarer Extinktionskoeffizient
λ	Wellenlänge

Extraktionsprozeduren s.6.5.1.
Laufmittelsysteme s.6.1.4.
Tests s.Tab.5
Klenk'sche Notation n:xwy s.5.3.1.

1. Einleitung

Die Fettsäuresynthese in eukaryotischen Organismen wird von zwei Multienzymkomplexen katalysiert, der Acetyl-CoA-Carboxylase und der Fettsäuresynthetase. Acetyl-CoA-Carboxylase katalysiert die Carboxylierung von Acetyl-CoA zu Malonyl-CoA, während an der Fettsäuresynthetase eine vielstufige Reaktion abläuft, die von Malonyl-CoA und Acetyl-CoA zu den langkettigen Fettsäureacyl-CoA-Verbindungen (LCFA-CoAs) (bei Hefe) bzw. zu den freien Fettsäuren (FFA) (bei Vögeln und Säugetieren) führt.

(I) $\text{Acetyl-CoA} + HCO_3^- + \text{ATP} \underset{Mg^{2+}}{\overset{(\text{ACC})}{\rightleftharpoons}} \text{Malonyl-CoA} + \text{ADP} + P_i$

(IIa) $\text{Acetyl-CoA} + 7\ \text{Malonyl-CoA} + 14\ \text{NADPH} + 14\ H^+ \xrightarrow{(\text{Hefe-FAS})} \text{Palmityl-CoA} + 7\ CO_2 + 7\ \text{CoA} + 14\ \text{NADP}^+$ (1,2,3)

(IIb) $\text{Acetyl-CoA} + 7\ \text{Malonyl-CoA} + 14\ \text{NADPH} + 14\ H^+ + H_2O \xrightarrow{(\text{Leber-FAS})} \text{Palmitinsäure} + 7\ CO_2 + 8\ \text{CoA} + 14\ \text{NADP}^+$ (4)

Die Carboxylierungsreaktion (I) läuft nicht in einem Schritt ab, sondern besteht aus den in Abb.1 formulierten Teilreaktionen. In der ersten Teilreaktion wird Biotin in einer ATP-, Mg^{2+}- und HCO_3^--abhängigen Reaktion carboxyliert. In der zweiten Teilreaktion findet dann ein Carboxyltransfer auf Acetyl-CoA statt.

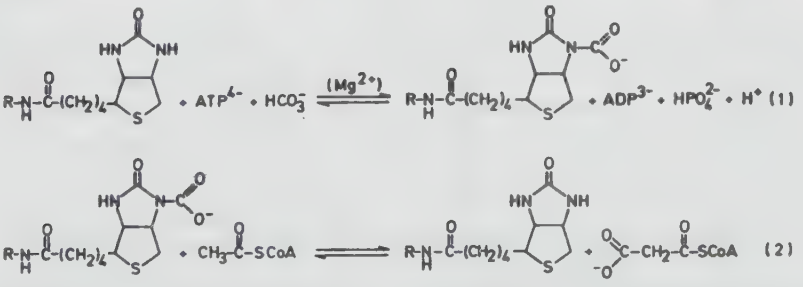


Abb.1: Reaktionsgleichung der Carboxylierung von Acetyl-CoA durch Acetyl-CoA-Carboxylase

Entsprechend sind auch für die Reaktionen (IIa) und (IIb) viele Einzelschritte notwendig, die von insgesamt 7 im Multienzymkomplex vorhandenen Teilaktivitäten katalysiert werden.

Eukaryotische Acetyl-CoA-Carboxylase (systematischer Name: acetyl-CoA:carbon-dioxide ligase (ADP-forming), EC 6.4.1.2) ist bisher u.a. aus Hühnerleber, Taubenleber, Rattenleber, Rinderfettgewebe sowie aus den Hefen Saccharomyces cerevisiae und Candida lipolytica isoliert worden. Alle diese Enzyme sind Multienzymkomplexe mit einem Biotingehalt von 1 Mol pro Untereinheit, während prokaryotische Acetyl-CoA-Carboxylase, z.B. aus Escherichia coli, aus drei funktionell verschiedenen Proteinen besteht, die jedes für sich bis zur Homogenität gereinigt worden sind (s.Tab.1). Biotin dient als Coenzym der Carboxylierung (s.Abb.1).

Eukaryotische Fettsäuresynthetase ist bereits aus einer Vielzahl von Materialien (Hefe, Leber, Fettgewebe, Brustdrüsen usw.) gewonnen worden. Obwohl 7 verschiedene Teilaktivitäten katalysiert werden müssen, bestehen diese Fettsäuresynthetasen, soweit bisher bekannt, nur aus zwei nicht identischen Polypeptidketten und sind daher ebenfalls Multienzymkomplexe. Prokaryotische Fettsäuresynthetase, z.B. aus Escherichia coli, besteht dagegen aus 7 vollständig voneinander trennbaren Proteinen (s.Tab.2), die nicht zu einem Multienzymkomplex aggregiert sind.

Im allgemeinen scheint im Rahmen der Enzymevolution eine Entwicklung begünstigt zu sein, die von Enzym-Systemen aus unifunktionellen Einzelenzymen zu Multienzym-Komplexen aus größeren multifunktionellen Polypeptiden führt (Beispiele: Fettsäuresynthetase, Acetyl-CoA-Carboxylase, Tryptophansynthetase). Sehr wahrscheinlich sind solche multifunktionellen Polypeptidketten durch die Fusion nebeneinanderliegender Gene entstanden, ein Vorgang, der von Yourno et al. am Beispiel zweier Enzyme der Histidin-Biosynthese in Salmonella typhimurium experimentell nachvollzogen werden konnte (13).

	polymere Form	monomere Form	Untereinheiten	Regulation
Escherichia coli (5)	-	nicht stabil; das Enzym dissoziiert bei der Anreicherung in die Einzelenzyme	Biotincarboxylase A_2 MG 98000 = 2x51000; Carboxyltransferase A_2B_2, MG 130000 = = 2x30000 + 2x35000; Biotincarboxylcarrierprotein A_2, MG 44000 = = 2x22000	keine Citratregulation
Saccharomyces cerevisiae (5)	-	A_4, MG 600000 bei Citratzugabe keine Änderung des Sedimentationsverhaltens	A, MG 150000	Aktivierung durch Fructose-1,6-diphosphat, α-Glycerophosphat, α-Ketobutyrat, Citrat; - LCFA-CoA
(6)			A, MG 189000	
Candida lipolytica (7)	-	-	A, MG 230000	
Weizenkeime (5)	-	AB, mittlere Stabilität (zwischen Escherichia coli und tierischem Enzym)	A, 7,3S ≙ Carboxyltransferase; B, 9,4S ≙ Biotincarboxylase + Biotincarboxylcarrierprotein	keine Aktivierung durch Citrat
Vogelleber (Huhn, Taube) (5)	polymere Filamente (im Mittel aus 20 Monomeren) MG 4-10x10^6, 72S	ABCD, MG 410000 1 Biotin, 1 Carboxylierungsstelle, 1 Citrat- und 1 Acetyl-CoA-Bindungsstelle	A, MG 117000 (enthält Biotin); B, MG 117000; C, MG 130000; D, MG 140000	+ Citrat (⟶ polymer) - LCFA-CoA
(8) (Huhn)	Stäbchenform, MG 1,1x10^7			
Rattenleber (5)	polymere Filamente 45S	AB, MG 215000 1 Biotin	A, MG 118000 B, MG 125000	+ Citrat (⟶ polymer) - LCFA-CoA Hepatomas: keine Hemmung durch LCFA-CoAs
(9)		A, MG 230000, 1Biotin	-	
Rinderfettgewebe (5)	polymere Filamente MG mehrere 10^6, 68S	MG 560000 2 Biotin		+ Citrat (⟶ polymer) - LCFA-CoA

Tab.1: Übersicht über die Eigenschaften einiger Acetyl-CoA-Carboxylasen
Zeichenerklärung: + positiver allosterischer Effektor
- negativer allosterischer Effektor

Tab.2: Übersicht über die Eigenschaften einiger Fettsäuresynthetasen

	MG	Untereinheiten	Bemerkungen
Escherichia coli	-	-	vorliegend als Einzelenzyme
Saccharomyces cerevisiae (1o)	$2,3x1o^6$ A_6B_6	A, MG 185ooo; B, MG 18oooo	enthält FMN Produkt: LCFA-CoA
Rattenleber (11)	46oooo--5ooooo AB?	MG 22oooo	enthält kein Flavin Produkt: FFA
Schweineleber (12)	478ooo		

1.1. Regulation der Fettsäuresynthese in tierischem Gewebe

a) Regulation der Acetyl-CoA-Carboxylase

Wie viele andere Multienzymkomplexe ist auch Acetyl-CoA-Carboxylase ein allosterisches Enzym. Als positive allosterische Effektoren (Aktivatoren) sind besonders die Tricarbonsäuren Citrat und Isocitrat (aber auch Fluorocitrat und (-)-Hydroxycitrat) zu nennen. Sie verschieben das Gleichgewicht von der inaktiven monomeren Form zur aktiven polymeren Form des Enzyms.

Negative allosterische Effektoren (Inhibitoren) sind zunächst Malonyl-CoA (K_i = $1o^{-5}$M für das Vogelleberenzym (14,15); kompetitive Hemmung in Bezug auf Acetyl-CoA und Citrat), das aber nur bei Überforderung der Kapazität der nachfolgenden Fettsäuresynthetase-Reaktion eine Rolle spielt, und dann besonders die LCFA-CoAs (16 bis 22), die bereits bei extrem niedrigen Konzentrationen hemmen (K_i ca. 3-8x$1o^{-7}$M (2o), für PCoA bei 3,75 mM Citrat K_i = 5,5 nM für das Rattenleberenzym (23); kompetitive Hemmung in Bezug auf Citrat, nichtkompetitiv in Bezug auf die Substrate Acetyl-CoA, HCO_3^- und ATP) und die das Gleichgewicht zur inaktiven monomeren Form der Acetyl-CoA-Carboxylase verschieben.

LCFA-CoAs sind starke Detergentien; z.B. hat PCoA eine kritische Micellenkonzentration (CMC) von ca. $2\text{-}4 \times 10^{-6}$ M (24). Viele Proteine besitzen daher hydrophobe Stellen, die LCFA-CoAs binden können, z.B. Serumalbumin, das als Schutz für LCFA-CoA-hemmbare Enzymreaktionen eingesetzt werden kann. Viele völlig verschiedene Enzyme werden von LCFA-CoAs unspezifisch gehemmt, z.B. Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase, Citratsynthase, Malat-Dehydrogenase, Glutamat-Dehydrogenase. Daher stehen manche Forscher auf dem Standpunkt, auch die Hemmung von Acetyl-CoA-Carboxylase durch LCFA-CoAs sei völlig unspezifisch.

Dagegen sprechen jedoch bereits die Tatsachen, daß der K_i-Wert für PCoA viel kleiner als die CMC ist, und daß die Rest-PCoA-Hemmung, die trotz BSA-Zusatz noch auftritt, durch Citratzusatz umgekehrt werden kann. Aus physiologischen Gründen wäre eine spezifische Hemmung der Acetyl-CoA-Carboxylase (im Gegensatz zu den oben erwähnten Enzymen) vernünftig, da LCFA-CoAs das Endprodukt der Fettsäuresynthetase-Reaktion (bei Hefe) bzw. der Acyl-CoA-Synthetase-Reaktion (in tierischem Gewebe) darstellen und daher eine feedback-Hemmung vorliegt.

Vor kurzem konnte die Arbeitsgruppe von S.Numa zeigen, daß es sich bei der Hemmung der Acetyl-CoA-Carboxylase durch PCoA um eine spezifische und physiologische Hemmung handelt (23): Bei kleinem Inhibitor/Enzym-Verhältnis ($\leq$ 5) bildet sich ein 1:1-Enzym-PCoA-Komplex (monomere Form). Bei Anwesenheit eines Acceptors für LCFA-CoAs (z.B. alkyliertes Cyclodextrin oder PC) spaltet Citrat den Enzym-Inhibitorkomplex unter voller Reaktivierung. Bei großem Inhibitor/Enzym-Verhältnis ($\geq$ 2o), das allerdings unter in vivo-Bedingungen nicht auftreten dürfte, wird jedoch PCoA in großem Überschuß gebunden. Nach Befreiung von dem Inhibitor erfolgt dann unspezifische Aggregation der Monomeren unter Verlust der Aktivität (wie bei Behandlung mit Natriumdodecylsulfat).

b) Regulation der Fettsäuresynthetase

Auch Fettsäuresynthetase wird von LCFA-CoAs gehemmt (25,26), und zwar kompetitiv in Bezug auf Malonyl-CoA, nichtkompetitiv

in Bezug auf Acetyl-CoA und NADPH. Somit könnte eine Kontrolle der Fettsäuresynthese theoretisch sowohl auf der Stufe der Acetyl-CoA-Carboxylase als auch der Fettsäuresynthetase erfolgen. Es kann jedoch durch die Untersuchungen von M.Sumper (27) als erwiesen gelten, daß in vivo nur die Hemmung der Acetyl-CoA-Carboxylase eine Rolle spielt. Beispielsweise beeinflußt eine PCoA-Konzentration, die Acetyl-CoA-Carboxylase zu 8o % inhibiert, die enzymatische Aktivität der Fettsäuresynthetase noch nicht.

Die für die Regulation der tierischen Acetyl-CoA-Carboxylase verantwortlichen Faktoren sind nochmals in folgender Tabelle zusammengestellt:

Tab.3: Protomer-Polymer-Übergang von tierischer Acetyl-CoA-Carboxylase (nach (5))

Protomer (inaktiv) $\rightleftharpoons$ Polymer (aktiv)

Gleichgewichtsverschiebung zum Protomeren begünstigt von:	Gleichgewichtsverschiebung zum Polymeren begünstigt von:
ATP-Mg^{2+} + HCO_3^-	Citrat, Isocitrat
Malonyl-CoA	Phosphat
LCFA-CoA	Albumin
alkalischem pH	pH 6,5 bis 7,o
NaCl (o,2M)	
niedrige Enzymkonzentration	hohe Enzymkonzentration

Im Gegensatz zu dem tierischen Enzym wird Acetyl-CoA-Carboxylase aus Escherichia coli nicht durch Citrat reguliert (s.Tab.1). Mögliche Gründe für diesen Unterschied werden in (5) diskutiert: In Escherichia coli wird Acetyl-CoA direkt aus Pyruvat gebildet, während in Eukaryonten das cytoplasmatische Acetyl-CoA aus dem mitochondrialen Citratpool stammt, so daß eine feed-forward-Aktivierung der von Acetyl-CoA-Carboxylase katalysierten Reaktion durch Citrat sinnvoll erscheint. Ein anderer Kontrollmechanismus ist in Escherichia coli auch deshalb angebracht, weil die schließ-

lich gebildeten Fettsäuren nicht wie in Leber oder Fettgewebe hauptsächlich in der Form von Glyceriden als eine Art Reserveenergiequelle gespeichert werden, sondern dort primär in Phospholipide als Strukturbestandteile der Membranen eingebaut werden.

Bei tierischem Gewebe ist eine Regulation der Fettsäuresynthese auf der Stufe der Acetyl-CoA-Carboxylase jedoch aus folgenden drei Gründen sinnvoll:
1) Die von Acetyl-CoA-Carboxylase katalysierte Reaktion führt ausschließlich zu den fettsäuresynthetisierenden Reaktionen hin und kann sich nicht weiter verzweigen, da keine andere Verwendungsmöglichkeit für Malonyl-CoA besteht.
2) Die Reaktion ist der frühestmögliche Punkt, an dem eine Kontrolle der Lipogenese stattfinden kann, da sie direkt vom Verzweigungspunkt Acetyl-CoA ausgeht (s.Abb.2).
3) Die Carboxylierung von Acetyl-CoA ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt bei der Fettsäuresynthese in tierischen Geweben (28,29).

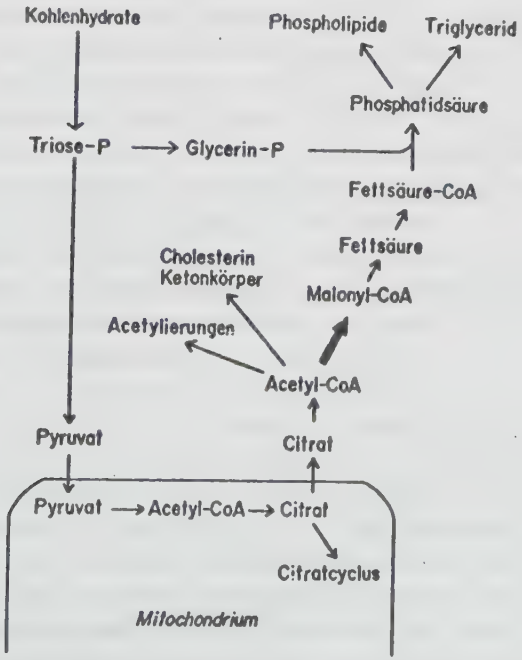


Abb.2: Schema der Lipogenese. Mit dem dicken Pfeil ist die Acetyl-CoA-Carboxylase-Reaktion bezeichnet.

Die ersten experimentellen Hinweise darauf, daß auch tatsächlich in vivo die Regulation der Fettsäuresynthese durch allosterische Kontrolle der Acetyl-CoA-Carboxylase erfolgt, wurden von W.M.Bortz und F.Lynen gefunden (17). Sie stellten in der Leber von normal gefütterten Ratten einen LCFA-CoA-Gehalt von 14,9 nMol/g NG und in der Leber von gefasteten Tieren 57,7 nMol/g NG fest. Später wurde gefunden, daß auch bei durch Alloxangaben künstlich erzeugtem Diabetes der Gehalt der Leber an LCFA-CoAs auf das 2- bis 4-fache steigt, während der Citratgehalt sowohl bei Fasten als auch bei Diabetes auf etwa die Hälfte des Normalwerts absinkt (3o). Durch diese Befunde wird ersichtlich, daß die feedback-Hemmung der Acetyl-CoA-Carboxylase durch LCFA-CoAs physiologisch sinnvoll ist, da die Synthese von Speicherlipiden im Zustand des Hungers so unterdrückt wird und anfallendes Acetyl-CoA (aus dem Fettsäureabbau) über Tricarbonsäurecyclus und Atmungskette zur Energiegewinnung verwendet wird.

Außer der soeben beschriebenen, sofort nach Änderung der Ernährungsbedingungen einsetzenden "Kurzzeitkontrolle" der Fettsynthese durch allosterische Regulation der enzymatischen Aktivität der Acetyl-CoA-Carboxylase gibt es auch noch eine "Langzeitkontrolle" bei länger dauerndem Nahrungsentzug, die darin besteht, daß einfach von vornherein weniger Enzym synthetisiert wird. Dieser Effekt ist besonders auch bei Hefen beobachtet worden. S.Numa's Arbeitsgruppe fand bei Untersuchung von Acyl-CoA-Synthetase-defekten Mutanten von Saccharomyces cerevisiae Hinweise darauf, daß LCFA-CoAs auch hier eine Rolle spielen, und zwar als Corepressor für die Reprimierung der Transcription der Acetyl-CoA-Carboxylase-mRNA (31). Hierzu paßt auch der Befund von P.Overath, daß in Escherichia coli LCFA-CoAs als Induktoren für die Enzyme der Fettsäure-ß-Oxidation (Thiolase, Crotonase, Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase) wirken (32).

Die über die ganze Zelle gemittelten Enzym- und Metabolitkonzentrationen vermitteln nur ein grobes Bild der Kontrolle der Lipogenese. Beispielsweise hat Citrat im Mitochondrium eine höhere Konzentration als im Cytoplasma (z.B. nach (33) in den Hepatocyten gefasteter Ratten o,94 mM im Mitochondrium und o,o79 mM im Cytoplasma), während die Fettsäuresynthese zum größten Teil

im Cytoplasma abläuft, so daß also eine direkte Korrelation der Fettsäuresynthese mit der Gesamtgewebekonzentration an Citrat in hohem Maße irreführend wäre.

Für die Untersuchung der in vivo-Regulation der Fettsäuresynthese ist es daher wichtig zu wissen, wie die beteiligten Enzyme Acetyl-CoA-Carboxylase und Fettsäuresynthetase und ihre allosterischen Effektoren in der lebenden Zelle kompartimentiert sind.

Hefe-Fettsäuresynthetase ist nach (34,35) nicht membrangebunden und ist ein rein cytoplasmatisches Enzym.

Auch tierische Acetyl-CoA-Carboxylase scheint im Cytosol lokalisiert zu sein; es gibt jedoch auch Hinweise auf eine Assoziation mit der Mikrosomenfraktion (36) bzw. auf eine Lokalisation in den Membranen des granulären cytoplasmatischen Reticulums (37), so daß diese Frage noch nicht abschließend geklärt ist.

Für die allosterischen Effektoren Citrat und LCFA-CoA konnten bisher noch keine Konzentrationsbestimmungen für die einzelnen zellulären Kompartimente in allen interessierenden Zellen einschließlich Hefe gemacht werden. Citrat ist enzymatisch zu labil und die Mehrzahl der bestehenden Zellfraktionierungsmethoden zu langsam, um eine Fraktionierung vor der Citratbestimmung ausführen zu können. Vor wenigen Jahren gelang E.A.Siess allerdings bei isolierten Leberzellen eine für die Konzentrationsbestimmung von Citrat und anderen Metaboliten hinreichend schnelle Fraktionierung in Mitochondrien und Cytosol (33) mit Hilfe der abgeänderten Digitoninmethode nach (38).

Bei LCFA-CoAs verhinderten bisher intrazellulär vorhandene Thioesteraseaktivitäten und die Acceptoreigenschaften von Membranen und Proteinen für diese Verbindungen Untersuchungen der Kompartimentierung. Im Arbeitskreis von S.Numa sind jedoch Mutanten von Candida lipolytica gefunden worden, die keine Acyl-CoA-Synthetase I (in der mikrosomalen Fraktion lokalisiert) enthalten (39,40), so daß man bei Annahme zweier unabhängiger LCFA-CoA-Pools in Analogie zu den beiden Acyl-CoA-Synthetasen im

Idealfall keine LCFA-CoAs in der mikrosomalen Fraktion dieser Mutanten finden sollte; die Microbodies, die nach wie vor die Acyl-CoA-Synthetase II enthalten, sollten dagegen den überwiegenden Teil der Gesamt-LCFA-CoA-Menge enthalten. Diese einseitige und von vornherein wahrscheinliche Verteilung der LCFA-CoAs in der Mutantenzelle, zusammen mit der in dieser Arbeit entwikkelten Isolierungsmethode, sollte eine Untersuchung der Kompartimentierung stark erleichtern und die Grundlage für Untersuchungen an komplizierteren Systemen liefern.

Außer dem Gesamtgehalt des Gewebes an LCFA-CoAs und ihrer Verteilung in den Organellen ist schließlich auch noch die Zusammensetzung der beteiligten Fettsäurereste von Interesse: Für die Regulation der Fettsäuresynthese ist zum Beispiel von Bedeutung, daß die K_i-Werte verschiedener LCFA-CoA-Derivate für die Hemmung der Acetyl-CoA-Carboxylase-Reaktion stark von der Art des Acylrestes abhängig sind (s.Tab.4). Am stärksten hemmt Stearyl-CoA, wohingegen Myristyl-CoA kaum noch Hemmung ausübt.

Tab.4: scheinbare Inhibitorkonstanten für LCFA-CoAs in Bezug auf die Acetyl-CoA-Carboxylase-Reaktion (Rattenleber) (verändert nach (2o))
Es wurde die Klenk'sche Notation der Fettsäurereste verwendet (Erklärung s.5.3.).

LCFA-CoA-Verbindung	K_i (µM)
1o:o	35
14:o	26
16:o	o,81
16:1w7	2,5
17:o	o,36
18:o	o,33
18:1w9	o,67

LCFA-CoAs dienen in der Zelle auch als Acyldonator zum Aufbau von Phospholipiden und Glyceriden. Wie die LCFA-CoA-Verbindungen, so hat daher auch jede Phospholipidspezies und jedes Glycerid, abhängig vom untersuchten Organ und Organell, seine charakteristische Fettsäurezusammensetzung (41). Beispielsweise sind in der sn-1-Position des Glycerins vorwiegend gesättigte, in der sn-2-Position dagegen eher ungesättigte Fettsäurereste zu finden. Dies ist auf die unterschiedliche Acyldonatorspezifität der beteiligten Enzyme Diacylglycerin-Acyltransferase, Glycerinphosphat-Acyltransferase, 1-Acylglycerinphosphat-Acyltransferase, 1-Acylglycerinphosphorylcholin-Acyltransferase zurückzuführen (42 bis 45).

Nachdem nun einige metabolische Hauptfunktionen der LCFA-CoAs kurz dargestellt worden sind, ist verständlich, daß ein großes Interesse daran besteht, den genauen Gehalt verschiedener Gewebe an LCFA-CoAs, ihre intrazelluläre Kompartimentierung und die prozentuale Beteiligung von verschiedenen Fettsäureresten messen zu können. Zur Verwirklichung dieser Vorhaben soll diese Arbeit einige Vorarbeiten leisten.

2. Coenzym A

2.1. Allgemeines

2.1.1. Einleitung

Alle Bestimmungsmethoden für LCFA-CoA-Thiolester beruhen auf Tests für die Grundverbindung, das Coenzym A (abgekürzt CoA oder CoA-SH). Daher sollen zunächst einige Eigenschaften dieser Verbindung sowie Möglichkeiten zu ihrer quantitativen Bestimmung beschrieben werden.

2.1.2. Eigenschaften von CoA

Die Formel von CoA sowie die Bezeichnungen der einzelnen Molekülteile sind in Abb.3 dargestellt:

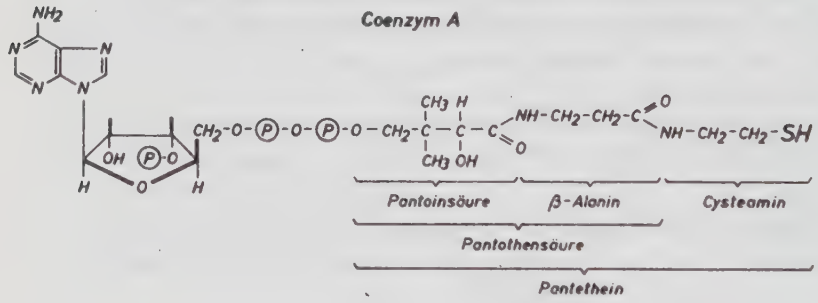


Abb.3: Formel von CoA

Eine Zusammenstellung der wichtigsten Eigenschaften von CoA findet man in (46):
Das Molekulargewicht beträgt 767 Dalton. CoA ist ein weißes amorphes Pulver, das in Wasser leicht- und in Aceton, Äther und Äthanol unlöslich ist. Ansonsten werden die Eigenschaften der Verbindung im wesentlichen von den Eigenschaften der einzelnen funktionellen Gruppen bestimmt:

a) Nucleotideigenschaften
(bedingt durch das Adenin)

Bei 260 nm hat CoA eine starke UV-Bande (molarer Extinktionskoeffizient $\varepsilon_{260} = 16{,}4 \times 10^6$ cm^2/Mol).

b) Säureeigenschaften
(bedingt durch die Phosphatgruppen)

Wäßrige CoA-Lösungen sind stark sauer. Die unlöslichen Hg-, Ag- und Cu-Salze des CoA werden auch bei saurem pH gefällt.

c) Mercaptaneigenschaften
(bedingt durch die Sulfhydrylgruppe des Cysteamins)

Die SH-Gruppe läßt sich spezifisch blockieren: reversibel u.a. durch p-Chloromercuribenzoat, irreversibel durch Iodessigsäure, Iodacetamid, N-Äthylmaleinimid, Succinimid.

CoA-SH kann auch leicht zu dem enzymatisch inaktiven CoA-Disulfid (CoA-S-S-CoA) oxidiert werden. Oxidationsmittel sind Luftsauerstoff, H_2O_2, I_2, MnO_4^-; Reduktionsmittel Zn/HCl, Na-Amalgam, H_2S, Thiole, $NaBH_4$. Bei Anwesenheit anderer Thiole (z.B. Glutathion, Cystein) kann es zur Bildung gemischter Disulfide kommen.

In Handelspräparaten liegt immer ein Teil des CoA als Disulfid vor; soll das Gesamt-CoA enzymatisch bestimmt werden, so muß CoA-S-S-CoA zunächst reduziert werden. Statt Thioglycol (Mercaptoäthanol) und Thioglycolsäure werden in letzter Zeit meist Dithiothreit (DTT) oder Dithioerythrit (DTE) verwendet (47), die schon in wesentlich geringerer Konzentration das CoA-Disulfid reduzieren. Die treibende Kraft bei dieser Reaktion ist die Bildung eines spannungsarmen Sechsrings (cyclisches Disulfid) und der damit einhergehende Entropiegewinn.

Die Beständigkeit von CoA ist von pH-Wert und Temperatur abhängig und ist u.a. auch in vorliegender Arbeit untersucht worden.

2.1.3. Notwendigkeit von kinetischem und stöchiometrischem Test

Nach (48 bis 5o) können die gegenwärtig verfügbaren enzymatischen CoA-Tests in zwei Gruppen unterteilt werden:
a) Reaktionen, bei denen CoA quantitativ umgesetzt wird und der stöchiometrische Umsatz eines Reaktionspartners gemessen wird (stöchiometrische Tests oder Endwertmethoden);
b) Tests, bei denen CoA in einer Folge von zwei oder mehr enzymkatalysierten Reaktionen stets wieder zurückgebildet wird (Recycling) und die Reaktionsgeschwindigkeit proportional der CoA-Konzentration ist, falls diese der einzige limitierende Faktor des Systems ist und die eingesetzten Enzyme mit den übrigen Substraten gesättigt sind (kinetische Tests).
Eine Übersicht über die gebräuchlichsten CoA-Tests gibt Tab.5.

Die kinetischen Tests sind wegen der theoretisch beliebig häufigen Umsetzung jedes einzelnen CoA-Moleküls und wegen der (ebenfalls theoretisch) beliebig ausdehnbaren Meßdauer sehr empfindlich; allerdings sind sie wegen der notwendigen Standardisierung eines Bezugspräparats recht kompliziert und wegen der gleichzeitigen Verwendung mehrerer Enzyme, die von allen möglichen in Rohextrakten befindlichen Metaboliten in ihrer Aktivität beeinflußt werden können, auch sehr störanfällig. Die in der Literatur beschriebenen Endwertmethoden sind zwar meist nicht so störanfällig - der stöchiometrische Ablauf einer Reaktion ist ja von der Aktivität des katalysierenden Enzyms unabhängig - aber dafür ist ihre Empfindlichkeit für die in Gewebeextrakten auftretenden Konzentrationen von CoA und seinen Thiolestern unzureichend. Für alle in dieser Arbeit beschriebenen CoA-Bestimmungen wurden daher zwei Tests verwendet: ein kinetischer Test für die CoA-Bestimmung in Extrakten und Aufschlüssen und eine Endwertmethode für die Gehaltsbestimmung einer zur Eichung des kinetischen Tests verwendeten CoA-Standardlösung.

Tab.5: Übersicht über die gebräuchlichsten enzymatischen Tests zur Bestimmung von CoA (nach (48,48,51))

a) Stöchiometrische Tests, Endwertmethoden:	
a1 Acyl-CoA-Synthetase (Thiokinase) (52,53)	Sorbat + CoA + ATP = Sorboyl-CoA + AMP + PP_i
a2 α-Ketoglutarat-Dehydrogenase (54)	α-Ketoglutarat + NAD^+ + CoA = Succinyl-CoA + NADH + H^+ + CO_2
a3 ATP-Citratlyase ("citrate cleavage enzyme") + Malat-Dehydrogenase (55,56)	(i) Citrat + ATP + CoA = Oxalacetat + Acetyl-CoA + ADP + P_i (ii) Oxalacetat + NADH + H^+ = Malat + NAD^+ Citrat + CoA + ATP + NADH + H^+ = Malat + Acetyl-CoA + ADP + P_i + NAD^+
a4 ß-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase (57)	CoA + Diketen = Acetacetyl-CoA (nichtenzymatisch) Acetacetyl-CoA + NADH + H^+ = L-3-Hydroxybutyryl-CoA + NAD^+
a5 Phosphotransacetylase (Phosphat-Acetyl-transferase) (58)	CoA + Acetylphosphat = Acetyl-CoA + P_i
b) Kinetische Tests:	
b1 Arylamin-Acetyltransferase (59 bis 62) (Ar-NH_2 = Sulfanilamid, p-Nitranilin)	(i) CoA + ATP + Acetat = Acetyl-CoA + AMP + PP_i (ii) Acetyl-CoA + Ar-NH_2 = $CH_3CONHAr$ + CoA Ar-NH_2 + Acetat + ATP = $CH_3CONHAr$ + AMP + PP_i
b2 α-Ketoglutarat-Dehydrogenase + Succinyl-CoA-Hydrolyse (54,63,64)	(i) α-Ketoglutarat + NAD^+ + CoA = Succinyl-CoA + NADH + H^+ + CO_2 (ii) Succinyl-CoA + H_2O = Succinat + CoA α-Ketoglutarat + NAD^+ + H_2O = Succinat + CO_2 + NADH + H^+
b3 Phosphotransacetylase + Arsenolyse (65)	(i) Acetylphosphat + CoA = Acetyl-CoA + P_i (ii) Acetyl-CoA + Arsenat = Acetylarsenat + CoA (iii) Acetylarsenat + H_2O = Acetat + Arsenat Acetylphosphat + H_2O = Acetat + P_i
b4 Phosphotransacetylase + Citratsynthase + Malat-Dehydrogenase (49,51)	(i) Acetylphosphat + CoA = Acetyl-CoA + P_i (ii) Acetyl-CoA + Oxalacetat + H_2O = CoA + Citrat (iii) Malat + NAD^+ = Oxalacetat + NADH + H^+ Acetylphosphat + Malat + NAD^+ + H_2O = Citrat + P_i + NADH + H^+

2.2. Endwertmethode

2.2.1. Vergleich verschiedener stöchiometrischer Methoden

Die wichtigsten stöchiometrischen Tests wurden in einer vergleichenden Studie von G.Michal und H.-U.Bergmeyer (48) untersucht; keine dieser Bestimmungsmethoden ist universell anwendbar.

Der Test mit ß-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase ist für alle Materialien geeignet und erlaubt eine Differenzierung von reduziertem und Gesamt-CoA; der Test ist jedoch zu wenig spezifisch, da auch fast alle Bruchstücke von CoA erfaßt werden (z.B. 3'-Dephospho-CoA, Pantethein, N-Acetyl-ß-alanyl-Cysteamin, N-Acetyl-Cysteamin).

Der Test mit Thiokinase (Acyl-CoA-Synthetase) ist die empfindlichste beschriebene Methode (Erfassungsgrenze ca.7o ng CoA/ml Küvetteninhalt bzw. 2oo ng CoA/ml Probelösung) und ist auch in Rohextrakten anwendbar. Allerdings wird 3'-Dephospho-CoA mit annähernd gleicher Geschwindigkeit wie CoA umgesetzt (kleinere Bruchstücke nicht mehr); auch ist das Enzym nicht im Handel erhältlich.

Der Test mit Phosphotransacetylase ist streng spezifisch für CoA; er ist sehr gut für die Gehaltsbestimmung reiner CoA-Lösungen (als Standard für den kinetischen Test) geeignet. Für Rohextrakte ist der Test dagegen aus den in 2.2.2. angeführten Gründen unbrauchbar.

Der Test mit "citrate cleavage enzyme" ist ebenfalls sehr spezifisch für CoA und ist auch für Rohextrakte brauchbar; das Enzym muß jedoch selbst angereichert werden und ist weniger als eine Woche haltbar, so daß dieser Test trotz seiner Vorteile kaum als Routinemethode in Frage kommt.

Nach Abwägung aller genannten Kriterien entschied ich mich zugunsten des Phosphotransacetylase-Tests, der in dieser Arbeit routinemäßig für die Gehaltsbestimmung von reinen CoA-Standardlösungen verwendet wurde; der gefundene Gehalt wurde dann als

Korrekturfaktor für die in biologischen Aufschlüssen mit dem kinetischen Test gefundenen CoA-Werte verwendet.

2.2.2. Prinzip, Eigenschaften, Störmöglichkeiten der Phosphotransacetylase-Methode (a5 aus Tab.5)

Der stöchiometrische Test mit Phosphotransacetylase aus Clostridium kluyveri stammt ursprünglich von E.R.Stadtman (58). Er wird normalerweise bei pH 7,6, dem Aktivitätsmaximum des Enzyms, durchgeführt. Die zugrundeliegende Reaktionsgleichung lautet:

(III) CoA-SH + Acetylphosphat $\xrightleftharpoons{(PTA)}$ Acetyl-SCoA + P_i

Die Gleichgewichtskonstante beträgt:

$$K' = \frac{(\text{Acetyl-CoA})\ (P_i)}{(\text{CoA-SH})\ (\text{Acetylphosphat})} = 74 \text{ (bei pH 8,o und } 28^{o}\text{C) (66)}$$

Wird Acetylphosphat im Überschuß zugesetzt, so läuft die Reaktion quantitativ ab und läßt sich als Endwertmethode verwenden. Meßgröße ist die Extinktionszunahme bei 233 nm, die aufgrund der im Produkt Acetyl-CoA vorhandenen Thioesterabsorption auftritt (molarer Extinktionskoeffizient $\varepsilon_{233} = 4{,}44 \times 10^{6}$ cm^2/Mol).

Das Enzym ist sehr spezifisch für CoA-SH. Desamino-CoA reagiert nicht, 3'-Dephospho-CoA reagiert mit ca.o,5 % der Geschwindigkeit von CoA (48). Auch CoA-Disulfid wird nicht umgesetzt und muß vor Messung zuerst reduziert werden (mit DTT oder DTE).

Die Endwertmethode mit Phosphotransacetylase kann zur Analyse von biologischem Material nicht ohne weiteres eingesetzt werden, da dessen Gehalt an Acetyl-CoA und Phosphat das Gleichgewicht nach links verschiebt, so daß die Reaktion auch bei Acetylphosphat-Überschuß nicht vollständig ablaufen kann. Das Enzym ist außerdem sehr empfindlich gegenüber Na^+; in Abwesenheit anderer Kationen wird es beispielsweise von o,o2 M Na^+ völlig gehemmt. K^+ und NH_4^+ aktivieren dagegen das Enzym.

2.2.3. Versuche zur Endwertmethode; Eigenschaften von CoA

Es wurde jeweils die Hälfte der in (67) angegebenen Mengen verwendet; d.h. es befanden sich in einem Testansatz (Volumen 1,155 ml):

100 µMol Tris-Puffer pH 7,6
5 µMol Acetylphosphat, KLi-Salz
x nMol CoA (maximal etwa 50 nMol)

Es wurde mit ca. 1U ≙ 1 µg Phosphotransacetylase gestartet.

Der Test ist bis 50 nMol ≙ 38,5 µg CoA/Küvette linear; eine typische Eichgerade zeigt Abb.4:

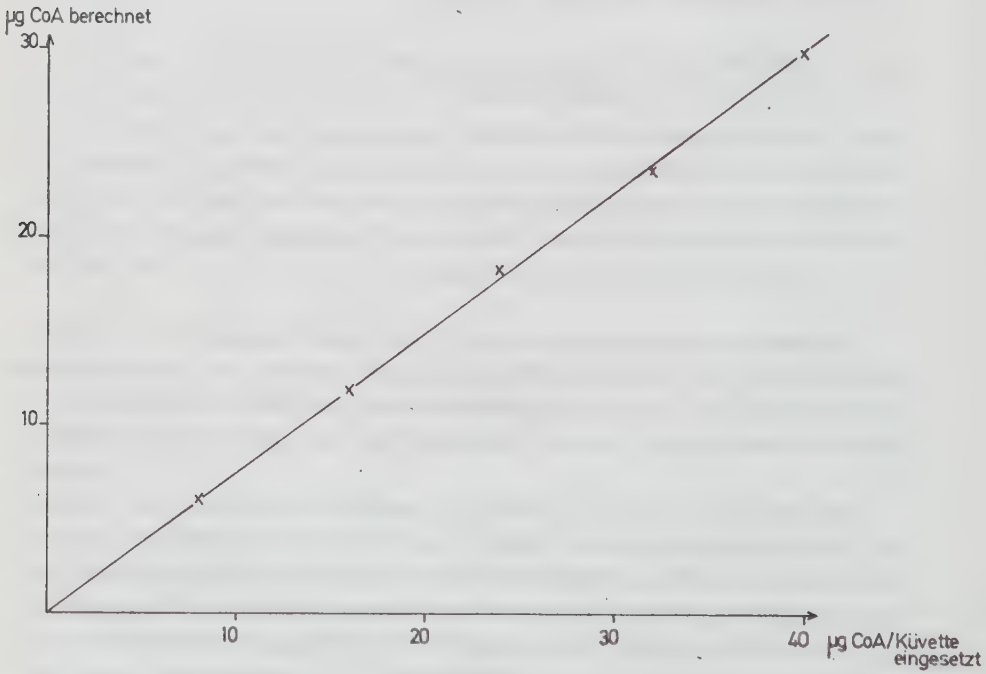


Abb.4: Eichgerade für Test a5
mittlerer Gehalt des eingesetzten $CoALi_3$: 74,3 ± 1,1 % (5)

Nach Mitteilung der Firma Boehringer, Tutzing, ist das Trilithiumsalz von CoA stabiler als die freie Säure. Da beide Formen im Handel sind, wurde zur Herstellung der Standardlösungen aus-

schließlich $CoALi_3$ verwendet, für die Synthese von CoA-Derivaten dagegen auch die freie Säure.

Wie oben bereits erwähnt, enthalten CoA-Handelspräparate, besonders nach längerer Lagerung, CoA-S-S-CoA, das von Phosphotransacetylase nicht umgesetzt wird. Daher wurde i.a. mit 1o mM DTT oder DTE vorinkubiert. Nach (47) soll diese Redoxreaktion bei leicht alkalischem pH am besten vor sich gehen. Wir stellten jedoch fest, daß die CoA-Standardlösung auch bei neutralem pH mit DTT vorinkubiert werden kann, ohne daß ein nennenswert niedrigerer Gehalt gemessen wird. In einer Versuchsreihe ergab sich bei Inkubation in Wasser ein Gehalt von 52,7 ± 3,3 %, während sich bei Inkubation in o,1 M Tris-Puffer pH 8,5 ein Gehalt von 53,9 ± 1,1 % errechnete. Die Veränderung des Redoxpotentials bei Erniedrigung des pH-Werts ist anscheinend nicht schwerwiegend genug, um den Entropiegewinn bei der Bildung des cyclischen DTT-Disulfids überzukompensieren.

DTT wird unter den Versuchsbedingungen von Acetylphosphat nicht acetyliert, weder nichtkatalytisch noch durch eine Unspezifität der Phosphotransacetylase.

Um die Beständigkeit von CoA bei verschiedenen Temperaturen zu prüfen, wurde eine 2oo µg/ml-CoA-Standardlösung längere Zeit im Kühlschrank gelagert, wiederholt eingefroren und wieder aufgetaut; eine andere Lösung wurde schließlich noch der Temperatur siedenden Wassers ausgesetzt. Die Ergebnisse zeigt Tab.6:

Tab.6: Temperaturbeständigkeit von CoA, gemessen mit der Endwertmethode mit Phosphotransacetylase

ursprünglicher Gehalt der 1. Lösung	56,9 ± 1,4 % (5)
16 Tage bei 4°C gelagert	5o,5 ± 1,6 % (5)
1x eingefroren(-2o°C) und wieder aufgetaut	49,2 ± 1,4 % (5)
2x eingefroren und wieder aufgetaut	5o,o ± o,7 % (4)
3x eingefroren und wieder aufgetaut	51,o ± 1,4 % (2)
ursprünglicher Gehalt der 2. Lösung	51,8 ± 3,4 % (3)
nach 1 Stunde bei 1oo°C	45,7 ± 3,4 % (3)

Bei wiederholtem Einfrieren und Auftauen ändert sich der CoA-Gehalt der Lösung also nicht; dagegen nimmt er bei einstündigem Erhitzen auf 1oo°C sowie bei längerer Lagerung bei 4°C geringfügig, aber signifikant ab. Die für die Eichung des kinetischen Tests verwendeten CoA-Standardlösungen wurden daher immer in kleinen Portionen eingefroren im Tiefkühlschrank aufbewahrt.

2.3. Kinetischer Test (Phosphotransacetylase/Citratsynthase/Malat-Dehydrogenase-Methode) (b4 aus Tab.5)

2.3.1. Vergleich verschiedener kinetischer Tests

Im folgenden sollen zunächst die verschiedenen kinetischen Testverfahren für CoA (vgl.Tab.5) miteinander kritisch verglichen werden:

In die Arylamin-Acetyltransferase-Reaktion können verschiedene lichtabsorbierende aromatische Amine eingesetzt werden (z.B. Sulfanilamid oder p-Nitranilin); sie kann entweder mit der in Tab.5 (Test b1) dargestellten Acetyl-CoA-Synthetase-Reaktion gekoppelt werden, aber auch mit anderen Acetyl-CoA-erzeugenden Systemen. Der Test ist nicht völlig spezifisch für CoA.

Der stöchiometrische CoA-Test mit α-Ketoglutarat-Dehydrogenase (Test a2 in Tab.5, in 2.2.1. nicht erwähnt; irreversibler Reaktionsablauf, aber unspezifisch gegenüber 3'-Dephospho-CoA und Produkthemmung durch NADH) kann durch Kopplung mit einer CoA-generierenden Reaktion (z.B.Arsenolyse mit Succinyl-CoA-Synthetase) in einen kinetischen Test (Test b2) verwandelt werden. Nachteile des - im übrigen sehr empfindlichen - Tests sind die erwähnte Unspezifität, der nichtlineare Verlauf mit NAD^+ und die Tatsache, daß das Enzym im Handel nicht erhältlich ist.

Den gekoppelten Tests b3 und b4 in Tab.5 liegt als erste Reaktion die durch Phosphotransacetylase aus Clostridium kluyveri katalysierte Acetylierung von CoA durch Acetylphosphat zugrunde, also dieselbe Reaktion, die in der in dieser Arbeit gewählten Endwertmethode abläuft. Die Methode b3 (65) gewinnt das CoA durch

nichtenzymatische Arsenolyse zurück (das zu jedem Zeitpunkt noch vorhandene Acetylphosphat muß allerdings zusätzlich noch als Hydroxamat gemessen werden), während die Methode b4 (49,51) das CoA mit Hilfe von Citratsynthase zurückgewinnt und dann, weil eine direkte Kopplung der Phosphotransacetylase-Reaktion mit einer NADH-erzeugenden oder -verbrauchenden Reaktion nicht möglich ist, schließlich noch eine dritte Enzymreaktion ankoppeln muß (Malat-Dehydrogenase). Alle verwendeten Enzyme sind im Handel erhältlich. Beide Tests haben Vor- und Nachteile:

Wegen der diskontinuierlichen Ausführung (Probenahmen während des Tests erforderlich) ist Test b3 umständlich zu handhaben. Test b4 kann dagegen in einer Küvette ablaufen und der Reaktionsverlauf kontinuierlich verfolgt werden. Die Notwendigkeit, die Aktivitäten der drei beteiligten Enzyme genau aufeinander abzustimmen, obwohl in getesteten Rohextrakten alle möglichen Stoffe enthalten sind, die diese Aktivitäten in unterschiedlicher Weise beeinflussen, ist jedoch bei diesem Test eine ständige Quelle von Fehlmessungen. Gleichwohl scheint sich Test b4 so bewährt zu haben, daß beispielsweise in H.-U.Bergmeyers "Methoden der enzymatischen Analyse" (67) neben den oben erwähnten stöchiometrischen Reaktionen als einziger kinetischer Test der Test b4 beschrieben ist. In der vorliegenden Arbeit wurde hauptsächlich Test b4 verwendet (dieses Kapitel 2.3.), aber auch Test b3 (in 2.4.).

2.3.2. Prinzip, Eigenschaften, Störmöglichkeiten der Phosphotransacetylase/Citratsynthase/Malat-Dehydrogenase-Methode

In dem schließlich gewählten CoA-Test (49,51) werden drei enzymkatalysierte Reaktionen miteinander gekoppelt, die Phosphotransacetylase-Reaktion (Enzym aus Clostridium kluyveri), die Citratsynthase-Reaktion, in der das eingesetzte CoA wieder zurückgebildet wird, und schließlich die Malat-Dehydrogenase-Reaktion, die den Bezug zwischen den beiden "Recycling"-Reaktionen und der Veränderung einer leicht photometrisch bestimmbaren Größe herstellt, und zwar der NADH-Konzentration und damit der Extinktion bei 340 nm. Die Reaktionen seien nochmals kurz dargestellt:

(IVa) Acetylphosphat + CoA = Acetyl-CoA + P_i

(IVb) Acetyl-CoA + Oxalacetat + H_2O = CoA + Citrat

(IVc) Malat + NAD^+ = Oxalacetat + NADH + H^+

(IV) Acetylphosphat + Malat + NAD^+ + H_2O = Citrat + P_i + NADH + H^+

Wenn die CoA-Konzentration limitierend für die Gesamtreaktionsgeschwindigkeit gewählt wird, d.h. alle Enzyme mit den übrigen Substraten gesättigt sind, ist die NADH-Bildungsrate und damit die Extinktionszunahme pro Zeiteinheit bei 340 nm der CoA-Konzentration direkt proportional. Da es sich um einen kinetischen Test handelt, muß mit einer bekannten Menge CoA geeicht werden; der Gehalt der als Standard verwendeten CoA-Lösung wird mit Hilfe der oben besprochenen Phosphotransacetylase-Endwertmethode ermittelt.

Nach (67) sollen gegenüber der Phosphotransacetylase-Endwertmethode die meisten Störungen wegfallen (insbesondere die Hemmung durch Na^+, Phosphat und Acetyl-CoA); wie in 2.3.1. schon erwähnt, wurden in dieser Arbeit jedoch gegenteilige Beobachtungen gemacht.

Wie beim stöchiometrischen Test mit Phosphotransacetylase besteht auch beim kinetischen Test eine geringe Unspezifität gegenüber 3'-Dephospho-CoA, die aber meist nicht weiter stört; CoA-S-S-CoA kann nur nach vorheriger Reduktion (mit DTT oder DTE) gemessen werden. Der Test unterscheidet natürlich nicht zwischen CoA und Acetyl-CoA; durch Abfangen des CoA mit N-Äthylmaleinimid ist es allerdings möglich, mit dem Test das Acetyl-CoA zu bestimmen und die CoA-Konzentration dann durch Subtraktion vom Gesamtgehalt an CoA + Acetyl-CoA zu ermitteln.

2.3.3. Versuche zum kinetischen Test; Eigenschaften von CoA

Es wurde jeweils die Hälfte der in (67) angegebenen Mengen verwendet; statt L(-)-Äpfelsäure wurde jedoch die doppelte Menge racemischer D,L-Äpfelsäure eingesetzt, und das Volumen der zupipettierten Probe wurde variiert (Volumenausgleich mit Wasser). In einem Testansatz (Volumen 1,075 ml) befanden sich also:

x nMol (CoA-SH + CoA-S-S-CoA + Acetyl-CoA)
(maximal o,6 nMol ≙ ca.o,5 µg CoA/Küvette)
15o µMol Triäthanolamin-Puffer pH 8,o
22,5 µMol D,L-Äpfelsäure (enzymatisch wirksam: 11,25 µMol L(-)-Äpfelsäure)
o,5 µMol DTT oder DTE
1,5 µMol NAD^+
5 µMol Acetylphosphat, KLi-Salz
1o,5 U ≙ 9,6 µg Malat-Dehydrogenase
7,5 U ≙ 7,5 µg Phosphotransacetylase

Es wurde mit 1,4 U ≙ 12,7 µg Citratsynthase gestartet und die Zunahme der Extinktion bei 334 nm gemessen (ΔE_{334}/min).

Eine Vorinkubation der CoA-haltigen Probenlösung mit DTT ist hier nicht erforderlich, da der Testansatz selbst DTT enthält.

Die Berechnung des CoA-Gehaltes der Probe erfolgt nach (67) mit der Formel:

$$(V) \qquad c_{Probe} = c_{Standard} \times \frac{(\Delta E/min)_{Probe}}{(\Delta E/min)_{Standard}} \quad (\mu g/Küvette \text{ bzw. } \mu g/einpipettiertes\ Probenvolumen)$$

Der Test ist etwa um den Faktor 5o bis 1oo empfindlicher als der stöchiometrische Test; typische Eichgeraden sind in Abb.11 und 17 enthalten.

Eingehendere Untersuchungen der Konzentrationsabhängigkeit der zeitlichen Extinktionsänderung ergaben, daß Linearität zwischen $\Delta E/\Delta t$ und der eingesetzten CoA-Menge mindestens bis 2 µg CoA/Küvette gewährleistet war; wir erhielten die empirische Beziehung:

$$(VI) \qquad \mu g\ CoA/Küvette = 53{,}8 \times \Delta E/\Delta t$$

(vgl. Anhang, Kapitel 2.6.)

Bei den in (68) und (69) angegebenen Modifikationen des Testverfahrens stellten wir keine Verbesserungen fest.

Übereinstimmend mit den mit Hilfe der Endwertmethode gefundenen Ergebnissen (vgl.2.2.3.) fanden wir im kinetischen Test keine signifikante Änderung des CoA-Gehalts bei wiederholtem Einfrieren und Auftauen der Lösung sowie bei Inkubation bei 3o°C und 1oo°C.

Schließlich wurde noch der Abbau von CoA (Konzentration 1oo µg/ml) in o,5 N HCl bei 3o°C untersucht. Aus den in Abb.5 dargestellten Meßwerten ergibt sich eine nur geringfügige Abnahme des CoA-Gehalts.

Auf den Einfluß von OH^--Ionen auf die Beständigkeit von CoA wird im Zusammenhang mit der Verseifung der LCFA-CoA-Verbindungen eingegangen werden (siehe Kapitel 3.3.).

2.3.4. Störungen des kinetischen Tests

Wurden gleiche Mengen CoA, gelöst in verdünnten Puffern verschiedenen pH-Werts (pH 1,3 bis 12,8), zum Test eingesetzt, so ergab sich keine signifikante Veränderung der Ergebnisse.

Höhere Pufferkonzentrationen können dagegen die CoA-Messung nach dem kinetischen Test ziemlich stark beeinflussen. In einer Versuchsreihe, in der konstant 1 µg CoA pro Küvette eingesetzt wurde, das aber jedesmal in einem anderen Puffer gelöst war (jeweils in 5o µl), wurden verschiedene ΔE_1-Werte gefunden: Praktisch keine Hemmung, verglichen mit Wasser, verursachten 2o mM Kaliumphosphat-Puffer pH 6,o und o,5 M Tris-Puffer pH 8,1; mittlere Hemmung (etwa um 1/3) trat bei 1 M Kaliumphosphat-Puffer pH 6,5 auf, und starke Hemmung (etwa um 2/3) bei ungepufferter 6 % $NaClO_4$-Lösung. Letzterer Fall ist besonders wichtig für die CoA-Messung in Perchlorsäureaufschlüssen, wie sie in Kapitel 4. beschrieben werden.

Auch organische Lösungsmittel, wie sie für zahlreiche, später zu beschreibende Extraktionsschritte Verwendung finden, hemmen den kinetischen Test. In Tab.7 sind einige bei Zugabe von Lösungsmitteln gefundenen Restaktivitäten aufgeführt (ΔE_1 in % von ΔE_1^o; $\Delta E_1 = \Delta E/1o$ min in der Probe mit Lösungsmittel oder anderen Hemmstoffen; $\Delta E_1^o = \Delta E/1o$ min im ungehemmten Standardansatz).

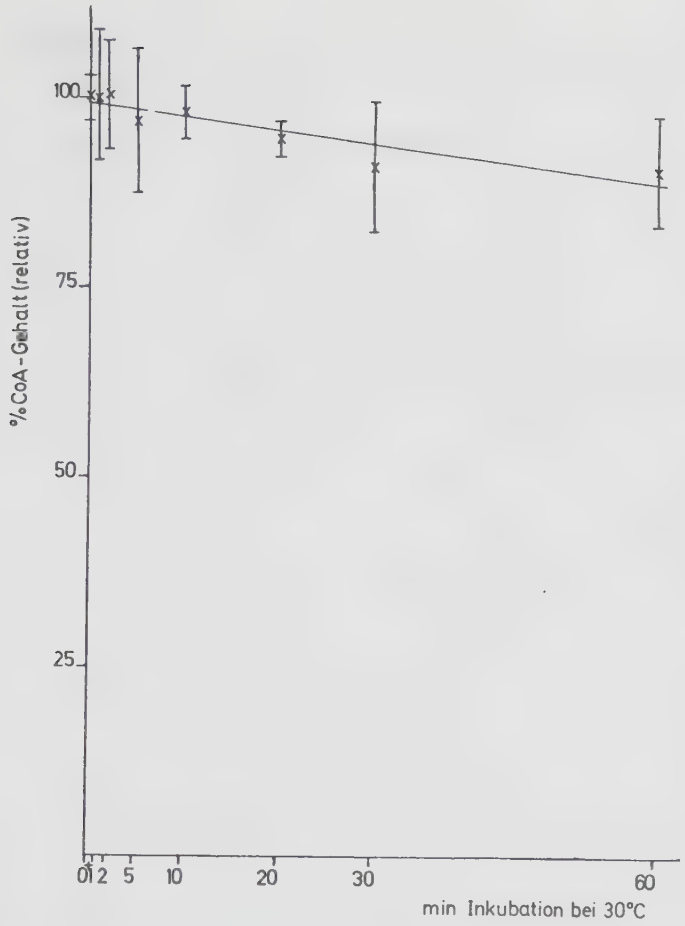


Abb.5: Abbau von CoA (1oo µg/ml) in o,5 N HCl (Test b4)

Um zu ermitteln, ob von einem durch Hemmung erniedrigten ΔE_1-Wert auf den der in einer Probe enthaltenen tatsächlichen CoA-Menge entsprechenden ΔE_1^o-Wert geschlossen werden kann, wurde in zwei Versuchsreihen die prozentuale Erniedrigung von ΔE_1 durch steigende Mengen Na^+ bzw. K^+ untersucht. In Abb.6 wurden o,4 µg, in Abb.7 1,5 µg CoA/Küvette eingesetzt. Die Hemmung erfolgte in Abb.6 durch steigende Mengen NaCl bzw. KCl, in Abb.7 durch 1 M Natriumphosphat-Puffer pH 7,2 bzw. 1 M Kaliumphosphat-Puffer pH 8,o.

Tab.7: Hemmung des kinetischen Tests durch verschiedene Lösungsmittel (je o,298 µg CoA/Küvette; korrigiert)

Lösungsmittel	zugesetzte Menge	ΔE_1 in % von ΔE_1^o
Pyridin	1o µl	51,8 %
	1oo µl	9,4 %
Diäthyläther	1o µl	91,o %
	1oo µl	62,o %
Äthanol	1oo µl	31,3 %
Phenolum liquefactum	1o µl	2o,9 %

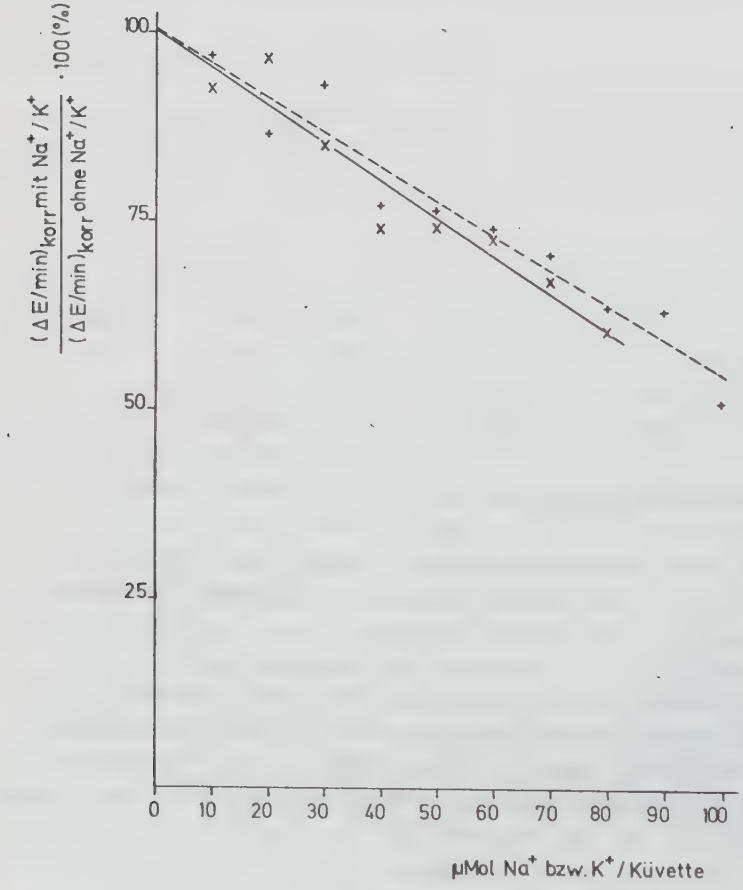


Abb.6: ΔE_1 in % von ΔE_1^o bei Hemmung mit Na^+ und K^+ (Gegenion: Cl^-) (Test b4) x——Na^+ +---- K^+

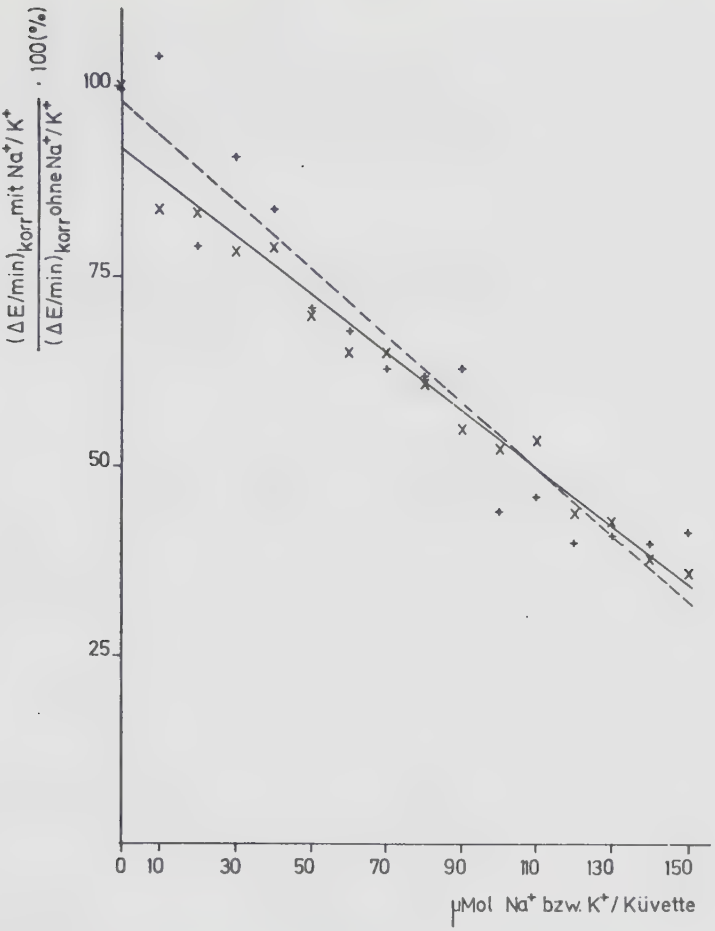


Abb.7: ΔE_1 in % von ΔE_1^o bei Hemmung mit Na^+ und K^+ (Gegenion: Phosphat) (Test b4) x—— Na^+ +--- K^+

Ein Vergleich der durch lineare Regression ermittelten Ausgleichsgeraden zeigt, daß alle vier Geraden im wesentlichen zusammenfallen (allerdings sind die Standardabweichungen teilweise beträchtlich), unabhängig von CoA-Konzentration und Art des Kations oder Anions. Das CoA selbst trägt wegen seines hohen Molekulargewichts so gut wie nichts zur Gesamtionenkonzentration bei. Dies heißt, daß der entscheidende Faktor bei der Hemmung durch Salze die Ionenstärke sein muß.

Unter gewissen Bedingungen, d.h. wenn die Ionenkonzentration in einer Probe genau bekannt ist oder eingestellt werden kann und wenn Einflüsse durch Lösungsmittelreste ausgeschlossen werden können, kann also auf den ΔE_1^o-Wert der ungehemmten Reaktion zurückgeschlossen werden.

Aus der etwa gleichartig verlaufenden Hemmung durch Na^+ und K^+ kann schließlich noch gefolgert werden, daß die in (67) angeführte antagonistische Wirkung der beiden Ionen auf Phosphotransacetylase (Hemmung durch Na^+, Aktivierung durch K^+) zumindest für den kinetischen Test ohne Bedeutung ist.

2.3.5. Einführung der Eichung des kinetischen Tests mit internem Standard und Herleitung der Grenzbedingungen

Im letzten Kapitel wurden Faktoren aufgezeigt, die den Reaktionsablauf nach dem kinetischen Test stören und den ΔE_1-Wert senken können. Die aus biologischem Material gewonnenen Aufschlußproben enthalten vielerlei den kinetischen Test störenden Ionen, Lösungsmittelreste und Metaboliten, deren Einflüsse noch gar nicht systematisch untersucht wurden; die parallel zu den Testproben als externe Standards verwendeten CoA-Lösungen enthalten dagegen keine störenden Bestandteile, so daß also nach Gleichung (V) für die Probe ein zu niedriger CoA-Gehalt berechnet wird. Da im Gegensatz zu den in 2.3.4. ausgewerteten Testansätzen die Ionen- und Metabolitkonzentrationen unbekannt sind und von Probe zu Probe wechseln, ist es meist nicht möglich, aus dem gemessenen ΔE_1-Wert die tatsächliche CoA-Konzentration genau zu berechnen; allenfalls kann ein Minimalwert abgeschätzt werden.

Wegen dieser - später noch im Kapitel über den Perchlorsäure-Aufschluß gezeigten - Schwierigkeiten war eine Eichung mit internem Standard wünschenswert, d.h.daß am Ende der Messung der unbekannten Probe noch eine bekannte Menge CoA in die gleiche Küvette einpipettiert wird und die beobachtete Steigerung der Geschwindigkeit der Extinktionszunahme bei 334 nm als $(\Delta E/min)_{Standard}$ in Gleichung (V) eingesetzt wird. Im folgenden sollen die Grundlagen und die Grenzbedingungen für diese Testausführung hergeleitet werden.

Um die Möglichkeit auszuschließen, daß die maximal erreichte Extinktionszunahmegeschwindigkeit ΔE_2/min (und damit auch die mit internem Standard berechnete CoA-Konzentration in der Probe) von dem Zeitpunkt der Zugabe des zusätzlichen CoA abhängig ist, wurde der interne Standard in 3 verschiedenen Mengen (a.Probe ≙ ≙ 1 µg, Standard ≙ 1 µg; b.Probe ≙ Blindwert, Standard ≙ 1 µg; c.Probe ≙ o,2 µg, Standard ≙ o,2 µg) und zu allen auf Grund der Testvorschrift (s.6.2.) möglichen Zeitpunkten zugegeben:

Gruppe 1: Zugabe des internen Standards vor der 15 min-Inkubation (4 Möglichkeiten)

Gruppe 2: Zugabe zwischen 15 min- und 5 min-Inkubation (4 Möglichkeiten)

Gruppe 3: Zugabe nach der 5 min-Inkubation (2 Möglichkeiten)

Gruppe 4: Zugabe nach 1o min Reaktionsablauf (1 Möglichkeit)

Die ΔE_2/1o min-Werte wurden auf 1 µg CoA/Küvette umgerechnet und innerhalb ihrer Gruppe und schließlich noch über die verschiedenen Konzentrationen des internen Standards gemittelt. Die Ergebnisse zeigt Tab.8.

Tab.8: Einfluß des Zeitpunkts der Zugabe des internen Standards auf ΔE_2/min

	$\frac{\Delta E_2/1o\ min}{\mu g\ CoA/Küvette}$
Gruppe 1	o,2o2 ± o,o12 (12)
Gruppe 2	o,2o2 ± o,o17 (12)
Gruppe 3	o,218 ± o,o15 (6)
Gruppe 4	o,2o4 ± o,o31 (5)

Der Zeitpunkt der Zugabe des internen Standards hat also keinen Einfluß auf das Ergebnis der CoA-Berechnung.

Wird ein Blindwert (d.h. ein vollständiger Testansatz, aber ohne CoA) angesetzt, zu dem nach 1o-minütiger Inkubation in gleichen Zeitabständen (ebenfalls 1o min) sukzessive gleiche Volumina 2o µg/ml-CoA-Standardlösung zugegeben werden, so kann man einen Extinktionsverlauf nach folgendem Schema beobachten (Abb.8):

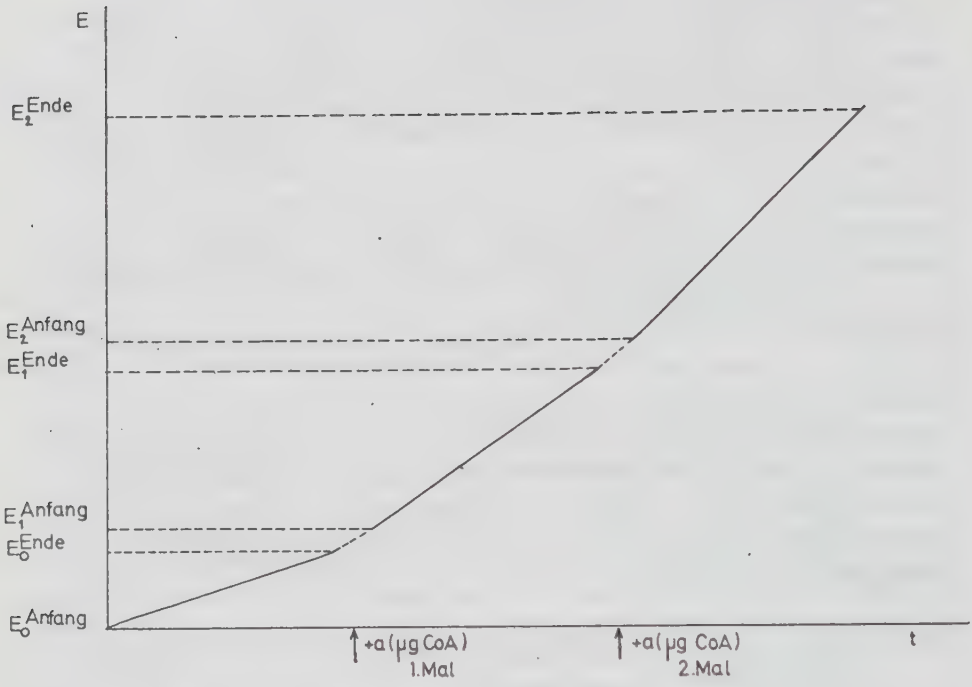


Abb.8: Schema der sukzessiven CoA-Zugabe nach Blindwertinkubation

Die Δ-Werte beziehen sich immer auf ein Zeitintervall von 1o min.

Zugabe von µg CoA			insgesamt in der Küvette
-	$\Delta E_o = E_o^{Ende} - E_o^{Anfang}$	-	-
a (1.Mal)	$\Delta E_1 = E_1^{Ende} - E_1^{Anfang}$	$(\Delta E_1)_{korr} = \Delta E_1 - \Delta E_o$	a (µg CoA)
a (2.Mal)	$\Delta E_2 = E_2^{Ende} - E_2^{Anfang}$	$(\Delta E_2)_{korr} = \Delta E_2 - \Delta E_o$	2a(µg CoA)
.....			
a (i-tes Mal)	$\Delta E_i = E_i^{Ende} - E_i^{Anfang}$	$(\Delta E_i)_{korr} = \Delta E_i - \Delta E_o$	i.a(µg CoA)
.....			
a (n-tes Mal)	$\Delta E_n = E_n^{Ende} - E_n^{Anfang}$	$(\Delta E_n)_{korr} = \Delta E_n - \Delta E_o$	n.a(µg CoA)

Auf eine Volumenkorrektur wurde verzichtet.

Im Idealfall sollten sich die blindwertkorrigierten $(\Delta E_i)_{korr}$-Werte wie die zum Zeitpunkt ihrer Messung im Testvolumen enthaltenen CoA-Mengen verhalten, das heißt:

(VII) $\frac{(\Delta E_i)_{korr}}{i.a} = \Delta E/\mu g\ CoA = konstant = F$

Dies ist aber schon deswegen nicht möglich, weil der Test auch bei einmaliger CoA-Zugabe zu Beginn nur bis ca.2,o µg CoA linear ist. Als begrenzender Faktor für die Konstanz von F, ohne die ja eine zuverlässige Gehaltsbestimmung einer unbekannten CoA-Lösung nicht möglich ist, kommt aber auch die am Ende eines 1o min-Laufs erreichte Gesamtextinktion E_i^{Ende} (bezogen auf die Extinktion vor der 1.CoA-Zugabe E_o^{Anfang} = o,ooo) in Frage. Welcher der beiden Faktoren hier die größere Rolle spielt, kann mit folgender Versuchsanordnung entschieden werden:

Es wurden 3 Testreihen angesetzt, bei denen unterschiedliche, innerhalb einer Reihe aber konstante Mengen CoA (1.Reihe: a = o,2 µg, 2.Reihe: a = o,4 µg, 3.Reihe: a = 1 µg) sukzessive zu einem "Blindwertsinkubationsansatz" zugegeben wurden, bis eine relative Gesamtextinktion E_n^{Ende} von ca.1,o erreicht wurde. Nach jeder Zugabe wurde 1o min gewartet und die entsprechende Extinktionsänderung ΔE_i gemessen. Gleichem E_n^{Ende} entsprechen dabei ganz verschiedene CoA-Konzentrationen.

In Abb.9 ist F gegen i.a (µg CoA/Küvette) und in Abb.1o gegen E_i^{Ende} aufgetragen. Sowohl mit steigender CoA-Menge als auch mit steigender Endextinktion sinkt der Faktor F ab; aber nur bei Auftragung gegen E_i^{Ende} wird eine Übereinstimmung der drei Testreihen, d.h.Unabhängigkeit der F-Funktion von a, erreicht. Das Anfangsplateau der Kurven in Abb.1o, also der Bereich, in dem F auch von E_i^{Ende} weitgehend unabhängig ist, geht bis zu einer Gesamtextinktion von ca.o,3 bis o,4. Bei Werten unter o,1 bis o,15 erhält man zwar im Mittel noch konstante Werte, jedoch sind die Fehlerbreiten bei so kleinen Extinktionsänderungen ziemlich groß. Mit konstantem F kann also gerechnet werden, wenn E_i^{Ende} etwa zwischen o,1 und o,4 liegt.

Auf der Grundlage der so gewonnenen Erkenntnisse, daß nämlich

1) der Zeitpunkt der Zugabe des internen Standards keinen Einfluß auf das Ergebnis der Berechnung hat, und daß

2) der Faktor F (s.Gleichung (VII)) bei sukzessiver Zugabe gleichbleibender CoA-Mengen nach Blindwertinkubation - unabhängig

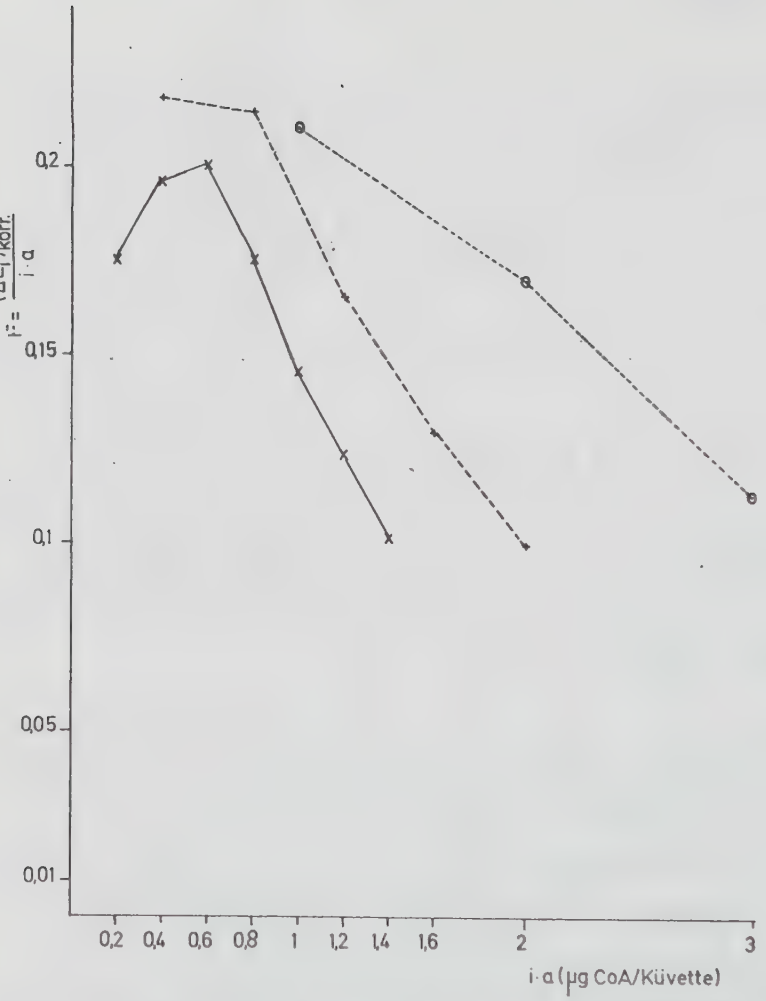


Abb.9: Abhängigkeit von F von der CoA-Menge pro Küvette bei sukzessiver CoA-Zugabe nach Blindwertinkubation
x—— a=o,2; +--- a=o,4; o••• a=1,o

von der Menge des zugesetzten CoA und von der Häufigkeit der CoA-Zugabe - bei einer Gesamtendextinktion zwischen o,1 und o,4 annähernd konstant ist und daher ein zuverlässiges Maß für die zu jedem Zeitpunkt vorhandene CoA-Menge darstellt,
wurde ein Test mit internem Standard entwickelt, der im Prinzip ebenfalls auf dem Schema in Abb.8 beruht. Auf Grund von 1) konnte

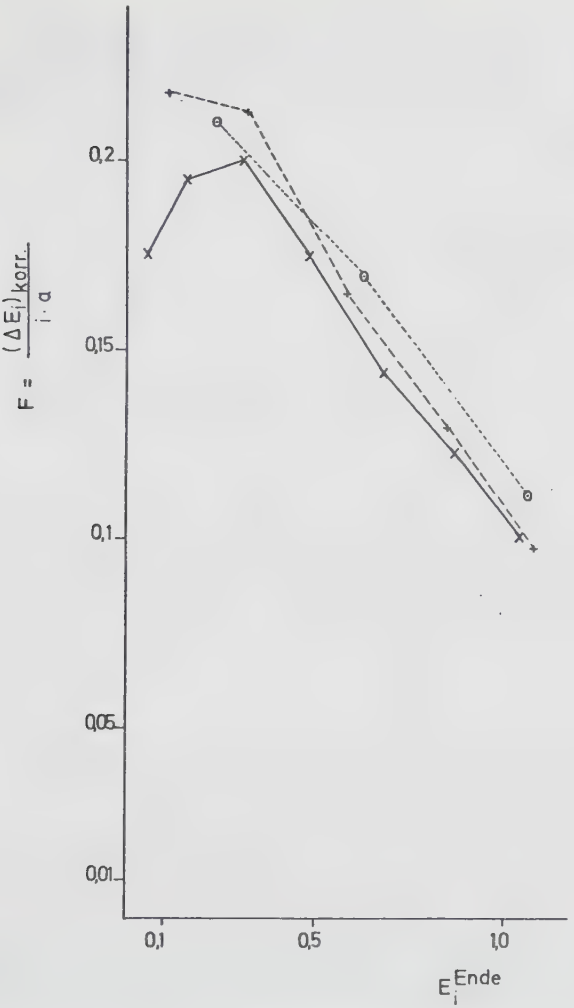


Abb.1o: Abhängigkeit von F von der Endextinktion bei sukzessiver CoA-Zugabe nach Blindwertinkubation
x—— a=o,2; +--- a=o,4; o... a=1,o

die Vorinkubation eines Blindwert-Ansatzes weggelassen und der Test gleich mit einer CoA-enthaltenden Probe gestartet werden (wie die Messung mit externem Standard); aus 2) wurde gefolgert, daß die zugegebenen CoA-Mengen a_i nicht konstant gehalten werden müssen, sondern beliebig variiert werden können, sofern man nur bestimmte Grenzbedingungen einhält. Die zu Beginn einpipettierte Probe enthält also eine variable, unbekannte Menge an CoA (a_{Probe}),

während die nach 1o min Lauf zugegebene CoA-Menge ($a_{Standard}$) als interner Standard festgehalten wird. Entsprechend Abb.8 und dem auf S.3o angegebenen Schema gilt also (alle ΔE-Werte beziehen sich auf Δt = 1o min):

$\Delta E_1 \triangleq a_{Probe}$

$\Delta E_2 \triangleq a_{Probe} + a_{Standard}$

$\Delta E = E_2 - E_1 \triangleq a_{Standard}$

Daraus folgt die Gleichung:

$$\text{(VIII)}\quad a_{Probe} = a_{Standard} \cdot \frac{\Delta E_1}{\Delta E}$$

Auf eine Volumen- und Blindwertkorrektur kann i.a. verzichtet werden.

Um die Anwendbarkeit dieses Tests zu prüfen, wurde die zu Beginn eingesetzte Menge CoA zwischen o und 1 µg/Küvette variiert und als interner Standard o,4 µg CoA/Küvette gewählt. Theoretisch sollte dann nach obiger Gleichung gelten:

$$\text{(VIIIa)}\quad \mu g\ CoA/Küvette = o,4 \times \frac{\Delta E_1}{\Delta E}$$

In Abb.11 und 12 sind ΔE_1, ΔE und $o,4 \times \frac{\Delta E_1}{\Delta E}$ = µg CoA (berechnet) gegen die zu Beginn eingesetzte CoA-Menge aufgetragen.

ΔE_1, das ja auch die Grundlage für den kinetischen Test mit externem Standard liefert, steigt erwartungsgemäß proportional mit der zu Beginn eingesetzten CoA-Menge; die Steigung der erhaltenen Geraden beträgt o,19o7, was einem Proportionalitätsfaktor (µg CoA)/(dE/dt) = 52,4 entspricht (nahezu völlige Übereinstimmung mit dem in Gleichung VI erhaltenen Faktor).

Die ΔE-Werte, die bei konstantem internem Standard ebenfalls konstant sein sollten, liegen auf einer leicht abfallenden Geraden, um die die Meßwerte relativ stärker als bei der ΔE_1-Gerade schwanken.

Die nach Gleichung (VIIIa) berechneten CoA-Werte (s.Abb.12) liegen bis ca.o,6 µg CoA/Küvette auf der theoretisch erwarteten Eichgeraden und beginnen erst bei höheren Werten stark davon

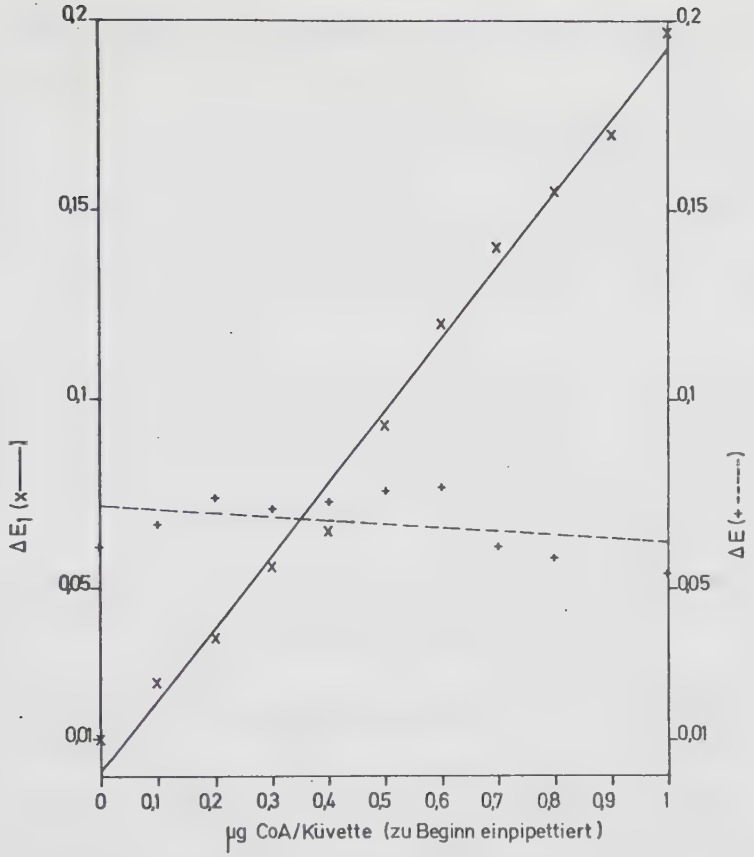


Abb.11: Test b4 mit konstantem internem Standard (a = o,4 µg)

abzuweichen (bei den letzten Werten handelt es sich nicht um Fehlmessungen, da sie durch eine Nachmessung bestätigt wurden). Bei o,6 µg CoA/Küvette übersteigt die bis dahin erreichte Gesamtextinktion E_4 den Wert o,35; und es ist anzunehmen, daß dieser Wert eine Grenzextinktion für diese Ausführung des Tests darstellt, bei deren Überschreitung mit größeren Fehlern gerechnet werden muß. Eine solche Interpretation steht in Einklang mit der in 2.3.5. und 2.6. gezeigten Existenz von "Grenzextinktionen" für zwei andere Ausführungsformen des Tests.

Wie aus weiteren Testreihen mit o,4 µg CoA als internem Standard hervorgeht, muß ebenso für ΔE ein unterer Schwellenwert von

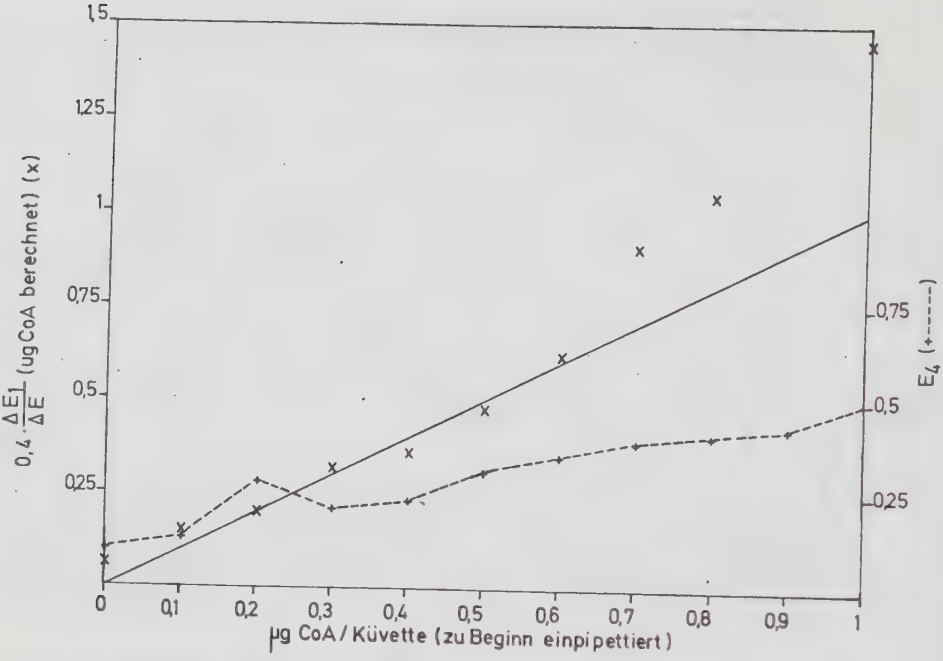


Abb.12: Eichkurve für Test b4 mit konstantem internem Standard (a = o,4 µg) —— theoretische Eichgerade

ca.o,o3 angesetzt werden, bei dessen Unterschreitung die Fehler bei der Berechnung des Quotienten o,4 x ($\Delta E_1/\Delta E$) zu groß werden (u.a. auch wegen der Vernachlässigung der Blindwertkorrektur). Dieser Wert entspricht etwa einer 5o-prozentigen Hemmung der Testenzyme. Auch für andere interne Standards ist $\Delta E_{min} \triangleq \triangleq 1/2 \cdot \Delta E_1^{\text{interner Standard}}$ eine zweckmäßige Grenzbedingung.

2.3.6. Vergleich zwischen der Auswertung des kinetischen Tests mit externem und mit internem Standard - Untersuchung des Einflusses verschiedener Hemmstoffe

In 2.3.4. wurde die Hemmung des kinetischen Tests durch organische Lösungsmittel und Salze kurz beschrieben und die Unmöglichkeit, bei einer Eichung mit externem Standard genaue Werte zu erhalten, dargestellt. In diesem Kapitel sollen nun die Vorteile der in 2.3.5. entwickelten Eichung mit einem internen Standard an Hand mehrerer Testreihen in Gegenwart eben dieser Hemmstoffe aufgezeigt werden.

a) Hemmung durch E2 bei konstanter CoA-Konzentration

"E2" hat die Zusammensetzung Isopropanol:Pyridin:Wasser = 1:1:2 und ist ein von uns für die Extraktion von LCFA-CoA-Verbindungen aus biologischem Material häufig benutztes Extraktionsmittel. Aus diesem Grund ist es interessant, seine Hemmwirkung in Bezug auf den kinetischen CoA-Test zu untersuchen. Da es Pyridin enthält, das nach Tab.7 eine starke Hemmung ausübt, wird auch für E2 eine ähnlich starke Hemmung erwartet.

Es wurden mehrere Tests mit o,4 µg CoA als internem Standard und einer konstanten, zu Beginn einpipettierten Menge von ebenfalls o,4 µg CoA/Küvette angesetzt, zu denen vor der 15 min-Inkubation verschiedene Volumina E2 gegeben wurden. Die Ergebnisse sind in Abb.13 und 14 wiedergegeben.

Aus Abb.13 ist ersichtlich, daß ΔE_1 und ΔE mit steigenden E2-Mengen absinken, und zwar liegt ΔE immer etwas unter ΔE_1 - d.h. daß die Reaktion am Ende langsamer abläuft als am Anfang - und fällt auch schneller ab. Ab etwa 5o µl E2/Küvette sinkt ΔE bereits unter die kritische Grenze von o,o3, so daß die ab dieser E2-Konzentration erhaltenen a_{Probe}-Werte überproportional anwachsen und für die Auswertung nicht mehr berücksichtigt werden dürfen. In Abb.14 sind die mit beiden Standards errechneten CoA-Gehalte in % der eingesetzten Menge (o,4 µg) gegen die E2-Zugabe aufgetragen. Der mit externem Standard berechnete Gehalt fällt, proportional zu ΔE_1, von 1oo % über 71 % bei 25 µl auf 36 % bei 13o µl E2-Zugabe ab, während der mit internem Standard berechnete Gehalt bei 25 µl E2-Zugabe noch 96 % beträgt - weitere Werte sind wegen der oben erwähnten Grenzbedingung allerdings nicht verfügbar.

b) Hemmung durch Natriumphosphat-Puffer bei konstanter CoA-Konzentration

In gleicher Weise wurde die Hemmung durch Zugabe von o,4 M Natriumphosphat-Puffer in einer Testreihe untersucht, in der die zu Beginn eingesetzte konstante CoA-Menge 1 µg und der interne Standard o,4 µg betrug. Die oben angeführten Grenzbedin-

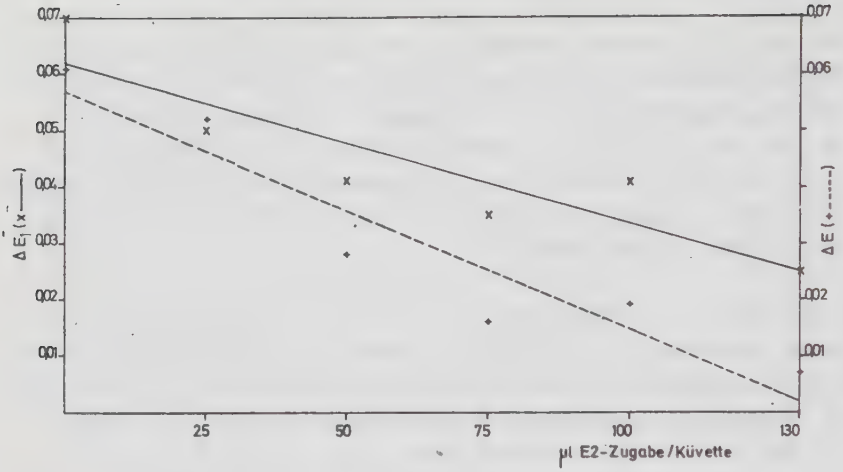


Abb.13: Einfluß von E2 auf Test b4
x—— ΔE_1 +--- ΔE

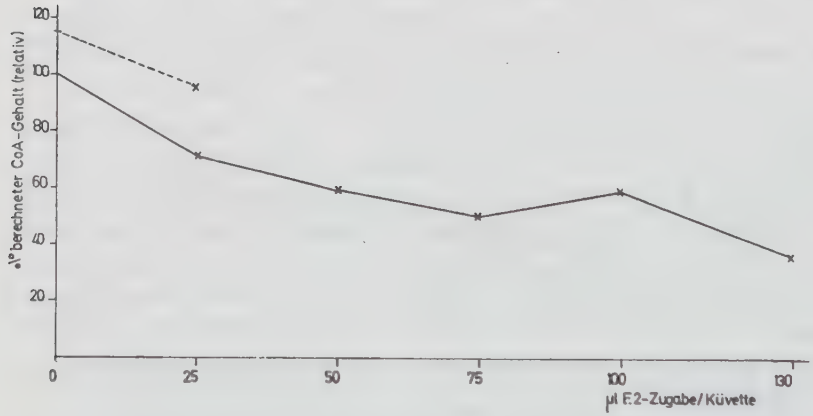


Abb.14: Beeinflussung von Test b4 mit internem und externem Standard durch E2
x—— externer Standard (ΔE_1 in % von ΔE_1^o)
+--- interner Standard (o,4.($\Delta E_1/\Delta E$) in % von o,4)

gungen für E_4 und ΔE wurden hier von allen Werten erfüllt. In Abb.15 sind ΔE und ΔE_1 (letzteres wegen der besseren Vergleichbarkeit mit ΔE sowie mit Abb.13 im o,4-fachen Maßstab) gegen µMol Na^+-Ionen in der Küvette aufgetragen. Im Gegensatz zu der Hemmung mit E2 sind die berechneten Ausgleichsgeraden sehr ähnlich; ΔE fällt im Durchschnitt etwas weniger stark als ΔE_1. Daher erhält man in Abb.16 (berechneter prozentualer CoA-Gehalt gegen µMol Na^+/Küvette) einigermaßen parallel laufende Kurven. Die beiden ersten mit internem Standard erhaltenen Werte liegen zu hoch; davon abgesehen, fällt der mit internem Standard berechnete CoA-Gehalt bei 36 µMol Na^+/Küvette nur auf 8o % ab, während der mit externem Standard berechnete Gehalt auf etwa 66 % sinkt.

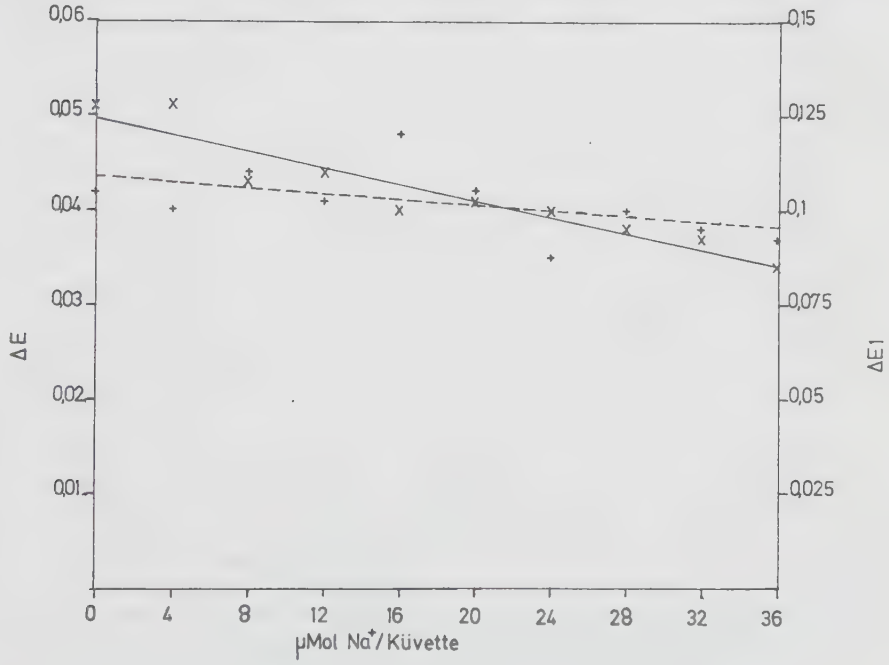


Abb.15: Einfluß von Natriumphosphat-Puffer pH 7,1 auf Test b4
x—— ΔE_1 +--- ΔE

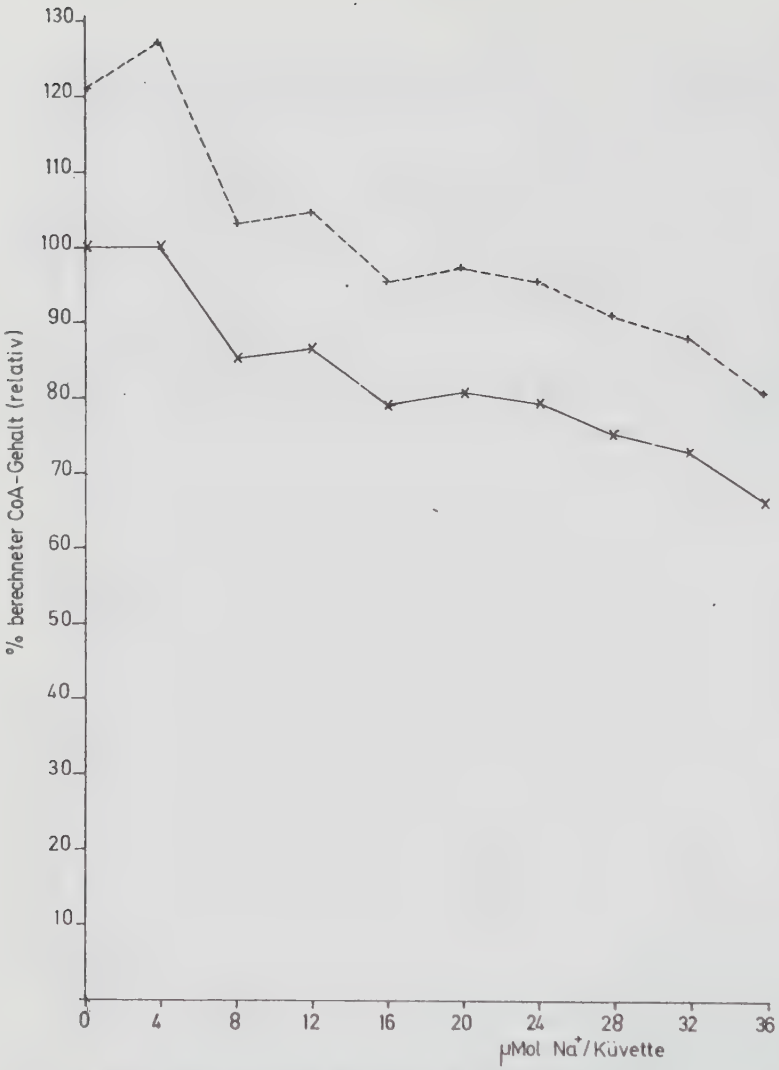


Abb.16: Beeinflussung von Test b4 mit internem und externem Standard durch Natriumphosphat-Puffer pH 7,1
x—— externer Standard (ΔE_1 in % von ΔE_t^o)
+--- interner Standard (o,4.($\Delta E_1/\Delta E$) in % von o,4)

c) Eichkurven im ungehemmten und durch Natriumphosphat-Puffer gehemmten Test

Um die Überlegenheit der Eichung mit internem über die mit externem Standard abschließend nochmals zu demonstrieren, wurden je 2 Eichkurven in einem unveränderten Testansatz sowie in einem Ansatz, der 4o µMol Na^+ in Form von Natriumphosphat-Puffer pH 7,1 enthielt, aufgenommen und miteinander verglichen. Um die Vergleichbarkeit zu sichern, wurde für den externen Standard derselbe Wert wie für den internen Standard, nämlich o,4 µg CoA/Küvette, gewählt. Die die oben angeführten Grenzbedingungen für die Berechnung nach dem internen Standard nicht erfüllenden Wertepaare wurden, wie üblich, weggelassen. Die Ergebnisse sind in Abb.17 und 18 dargestellt.

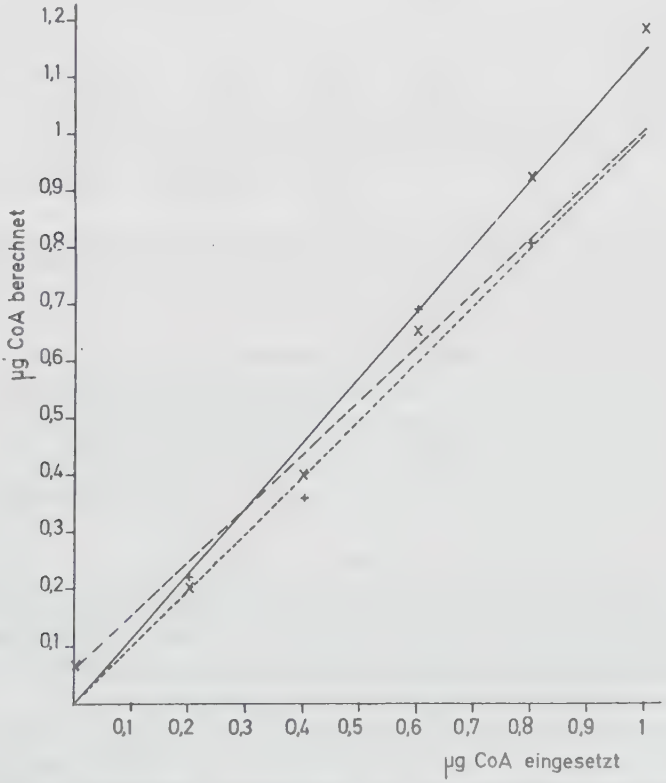


Abb.17: Eichgerade für Test b4 mit o,4 µg internem und externem Standard im unveränderten Testansatz (H_2O)
x—— externer Standard
+--- interner Standard

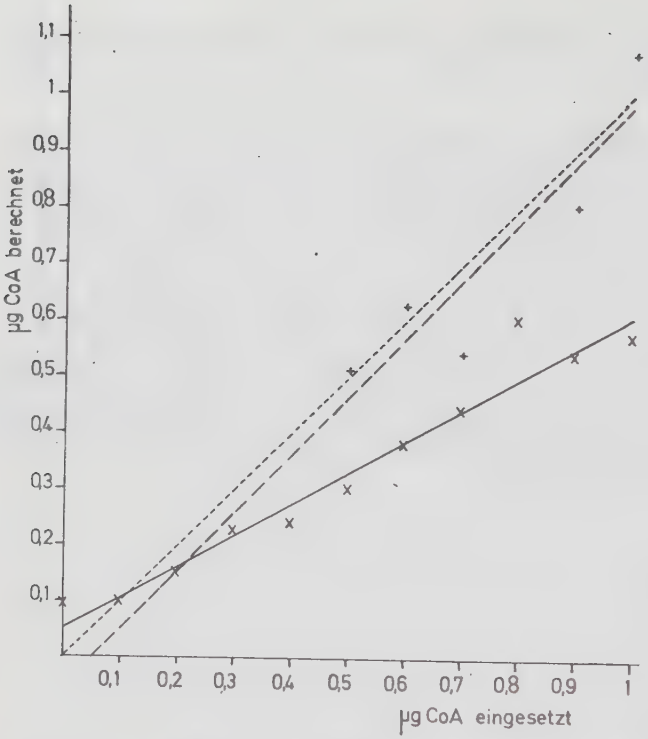


Abb.18: Eichgerade für Test b4 mit o,4 µg internem und externem Standard in Gegenwart von 4o µMol Na^+ (Natriumphosphat-Puffer pH 7,1)
x—— externer Standard
+--- interner Standard
····· y = x (theoretische Eichgerade)

Wie zu erwarten, stimmen die Eichkurven im ungehemmten Ansatz in etwa überein (Wiederfindung: extern 114,9 %, intern 95,o %), während die mit internem Standard berechnete Eichkurve im Na^+-gehemmten Test wesentlich besser abschneidet (Wiederfindung: extern 55,o %, intern 1o2,3 %).

Weitere Eichkurven, in denen die bei externer bzw. interner Eichung berechneten CoA-Gehalte in einem Testansatz mit Hemmstoff miteinander verglichen werden, sind in Kapitel 4. im Zusammenhang mit dem Perchlorsäure-Aufschluß angeführt.

2.4. Kinetischer Test (Phosphotransacetylase/Arsenolyse/Hydroxamsäure-Methode) (b3 aus Tab.5)

2.4.1. Prinzip der Phosphotransacetylase/Arsenolyse/Hydroxamsäure-Methode

Wie die in 2.2. beschriebene Endwertmethode und der in 2.3. dargestellte kinetische Test, so benutzt auch der in diesem Kapitel beschriebene kinetische Test als erste Teilreaktion die durch Phosphotransacetylase aus Clostridium kluyveri katalysierte Acetylierung von CoA mit Hilfe von Acetylphosphat. Im Gegensatz zu Test b4 wird das CoA hier allerdings durch nichtenzymatische Umsetzung mit Arsenat recyclisiert. Das gebildete Acetylarsenat ist viel unbeständiger als Acetylphosphat und hydrolysiert schon bei Raumtemperatur zu Acetat und Arsenat. Die Reaktionen sind in folgendem Schema nochmals kurz dargestellt:

(IXa) Acetylphosphat + CoA = Acetyl-CoA + P_i
(IXb) Acetyl-CoA + Arsenat = Acetylarsenat + CoA
(IXc) Acetylarsenat + H_2O = Acetat + Arsenat

(IX) Acetylphosphat + H_2O = Acetat + P_i

In der Summengleichung erscheinen Phosphotransacetylase, CoA und Arsenat gleichermaßen als Katalysatoren für die Hydrolyse des gemischten Säureanhydrids Acetylphosphat zu Acetat und Phosphat; bei Einhaltung bestimmter Bedingungen ist daher eine Proportionalität der Abnahmegeschwindigkeit der Acetylphosphatmenge zu der Konzentration an Phosphotransacetylase bzw. CoA bzw. Arsenat - jeweils bei Konstanthalten der beiden anderen Konzentrationen - zu erwarten.

Wie in 2.2.2. angeführt, ist Phosphotransacetylase spezifisch für CoA - mit Bruchstücken erfolgt so gut wie keine Reaktion - und sehr anfällig gegenüber Hemmung durch Na^+-Ionen, weswegen nach (65) Kalium- und nicht Natriumarsenat verwendet werden soll.

Nach (65,66,7o) soll der Verlauf der Arsenolysegeschwindigkeit bis mindestens o,633 mM CoA und bis o,1 M Arsenat linear sein. Eine Sättigungskonzentration für CoA wurde nicht angegeben.

Die Reaktionsgeschwindigkeit soll konstant sein, bis 85 bis 90 % des Acetylphosphats zersetzt sind. Die Geschwindigkeitsmessung erfolgt in der Weise, daß der Reaktionsmischung nach bestimmten Zeiten Aliquote entnommen werden und der Acetylphosphat-Gehalt der Lösung mit Hilfe der Hydroxamsäure-Methode bestimmt wird.

F.Lipmann beschrieb schon 1945 eine Methode zur Bestimmung von Acylphosphaten, die auf ihrer Umsetzung mit Hydroxylamin zu Hydroxamsäuren beruht (71):

(X) $R\text{-}COOPO_3^{2-} + H_2NOH = R\text{-}CONHOH + HOPO_3^{2-}$

Die Reaktion läuft bei Raumtemperatur bei pH 6,5 bis 7 in relativ kurzer Zeit quantitativ ab. Carbonsäureanhydride, -chloride, -thiolester und N-Acylimidazole reagieren mit vergleichbarer Geschwindigkeit (ß-Ketosäure-Thioester ergeben Pyrazolone); die Reaktion mit Carbonsäureamiden und -estern sowie mit Aldehyden und Ketonen kann unter den Versuchsbedingungen vernachlässigt werden.

Die entstandene Hydroxamsäure ist tautomer:

(XI) $R\text{-}\overset{O}{\overset{\|}{C}}\text{-}NHOH \rightleftharpoons R\text{-}\overset{OH}{\overset{|}{C}}\text{=}NOH$

Die im Gleichgewicht vorliegende enolanaloge Gruppierung ist dafür verantwortlich, daß sich mit Fe^{3+}, das in der Form von $FeCl_3$ eingesetzt wird, ein rotvioletter Komplex bildet. Die Hydroxamsäure kann aufgrund der Absorption des Fe^{3+}-Komplexes zwischen 540 und 480 nm (vorzugsweise bei 546 nm) quantitativ bestimmt werden; die Nachweisgrenze liegt bei 0,25 µMol Acylphosphat. $FeCl_3$ absorbiert in diesem Bereich nicht. Anionen, die Fe^{3+} komplexieren (nach (70) F^-, Phosphat, Oxalat, Sulfat, nicht aber Citrat), stören in höheren Konzentrationen.

2.4.2. Versuche zur Hydroxamsäuremethode; Eigenschaften von Acetylphosphat

Zunächst wurde eine Eichkurve für die Acetylphosphat-Bestimmung nach der Hydroxamsäuremethode aufgenommen; als Referenzstandard

verwendeten wir authentische Succinhydroxamsäure oder Acethydroxamsäure. Aus Abb.19 ist ersichtlich, daß die für Acetylphosphat und Succinhydroxamsäure erhaltenen Werte sehr genau auf einer Geraden liegen.

Der Testansatz nach (7o), mit dem auch die Eichgerade in Abb.19 aufgenommen wurde, enthält im Volumen 6 ml:

x	µMol Acetylphosphat (oder Succinhydroxamsäure)
2	mMol H_2NOH
5o	mg $FeCl_3$

Meßgröße ist die gegen einen Blindwert korrigierte Extinktion bei 546 nm. Aus Abb.19 ergibt sich ein mittlerer Korrekturfaktor

$$F = \frac{E_{546}^{(korr)}}{\mu Mol\ Hydroxamsäure} = o,12o6 \pm o,oo11\ (8).$$

Durch die Wahl eines kleineren Testvolumens läßt sich die Empfindlichkeit der Hydroxamsäuremethode noch steigern. Der analoge Testansatz nach (46) enthält im Volumen 2 ml:

Abb.19: Eichgerade für die Hydroxamsäuremethode nach (7o)

x µMol Acetylphosphat (oder Succinhydroxamsäure)
1 mMol H_2NOH
8,3 mg $FeCl_3$

Dieser Ansatz wurde ebenfalls häufig von uns verwendet; der Korrekturfaktor ist etwa 3mal so groß wie im Test nach (7o). Auf die Wiedergabe einer Eichgerade wird hier verzichtet.

Nach (72) ist Acetylphosphat - im Gegensatz zu Acetylarsenat - zwar bei Raumtemperatur beständig, hydrolysiert aber bei 1oo°C ziemlich schnell, besonders zwischen pH 3 und 5. Wir konnten dies bestätigen, indem wir eine 114 mM Acetylphosphat-Lösung 5 min lang auf 1oo°C erhitzten und sie nach Abkühlung auf o°C mit Hilfe der Hydroxamsäuremethode testeten. Das Acetylphosphat wurde quantitativ hydrolysiert. Diese Eigenschaft kann zur gleichzeitigen Bestimmung von Acetylphosphat, Acetyl-CoA und Acyl-CoAs in derselben Lösung ausgenutzt werden, da CoA-Thiolester unter vergleichbaren Bedingungen nicht zersetzt werden.

2.4.3. Optimierung der Phosphotransacetylase/Arsenolyse/ Hydroxamsäure-Methode

In den in der Literatur beschriebenen Testansätzen nach der Phosphotransacetylase/Arsenolyse/Hydroxamsäure-Methode läßt man i.a. zuerst die Arsenolyse eine definierte Zeit bei einer definierten Temperatur ablaufen und bestimmt dann in einem zweiten Schritt die noch vorhandene Acetylphosphat-Menge in einem Aliquot der Inkubationsmischung mit einem der beiden in 2.4.2. angeführten Tests nach der Hydroxamsäuremethode. Die Arsenolyse-Mischung nach (46) enthält im Volumen 1,1 ml:

x nMol CoA
1oo µMol Tris-Puffer pH 8,o
6,84 µMol Acetylphosphat, KLi-Salz
1o µMol Cystein-Hydrochlorid
7,5 U ≙ 7,5 µg Phosphotransacetylase
5o µMol Kaliumarsenat

Entnimmt man nach verschieden langer Inkubationsdauer bei 37°C 2oo µl-Aliquote und bestimmt den Acetylphosphat-Gehalt mit dem 2. Testansatz in 2.4.2., so erhält man eine Schar von Eich-

kurven, die bei umso niedrigeren CoA-Konzentrationen abknicken, je länger die Arsenolysedauer gewählt wird (Abb.2o). Der Test ist also bei weitem nicht bis zu so hohen CoA-Konzentrationen linear, wie in der Literatur angegeben (vgl.2.4.1.). Übrigens tritt eine langsame Zersetzung des Acetylphosphats im Arsenolyse-Ansatz - etwa 1o % in 5o min - auch schon ohne CoA-Zusatz ein.

Bei Verwendung von in verschiedenen Puffern gelöstem CoA konnten wir beobachten, daß weniger der pH-Wert als die Molarität und Zusammensetzung des Puffers eine Rolle spielt. Insbesondere störten in unserem System Na^+-Ionen (durch Hemmung der Phosphotransacetylase) und Citrat (durch Komplexbildung mit Fe^{3+}), letzteres im Widerspruch zu den in (7o) gemachten Angaben.

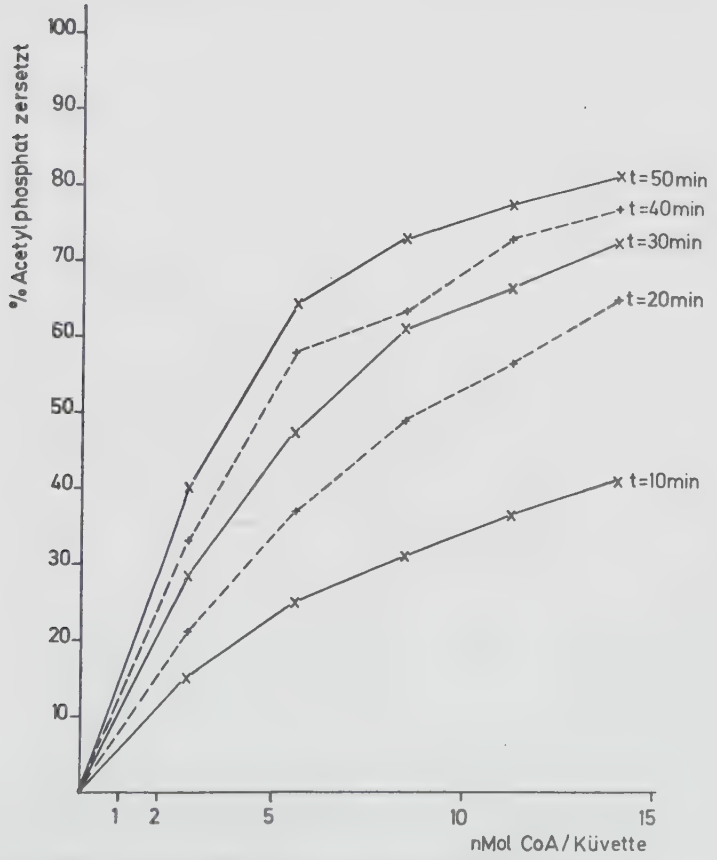


Abb.2o: Eichkurven für Test b3 nach (46)

Um die Empfindlichkeit des Tests zu steigern und die Störungen durch Bestandteile der CoA-enthaltenden Probelösung gering zu halten, wurden einige Veränderungen eingeführt. Unter anderem wurde Wasser durch Tris-Puffer pH 8,o ersetzt, Cystein.HCl durch DTE, der ebenfalls in Tris-Puffer gelöst wurde. Das Volumen der Arsenolysemischung wurde auf o,5 ml reduziert, um die Bestimmung einschließlich des Hydroxamsäuretests nach dem 2. Ansatz in 2.4.2. in einer Küvette durchführen zu können. Der Testansatz enthielt schließlich:

(28o-x-y)	µMol	Tris-Puffer pH 8,o
2,28	µMol	Acetylphosphat, KLi-Salz
1	µMol	DTE
x	µl	CoA-Lösung
y	µl	Phosphotransacetylase ≙ o,75 y (U) ≙ o,75 y (µg)

5 min Inkubation bei 37°C (Volumen 4oo µl)

5o	µMol	Kaliumarsenat pH 8,o

t (min) Inkubation bei 37°C (Volumen 5oo µl)

1	mMol	H_2NOH

15 min Inkubation bei 37°C (Volumen 1 ml)

8,3	mg	$FeCl_3$

Gesamtvolumen 2 ml (genaue Vorschrift s.6.2.4., 2.Ansatz)

Die CoA-Menge wurde zwischen o und 8 nMol/Küvette variiert, um im linearen Anfangsteil der Eichkurve zu bleiben und weil höhere Werte bei der CoA-Messung in Aufschlußproben i.a. nicht erreicht werden. Unabhängig davon wurden y und t variiert und die Kurvenscharen (A), (B) und (C) graphisch dargestellt.

(A) % zersetztes Acetylphosphat gegen die CoA-Menge für verschiedene y/t-Kombinationen

(B) % zersetztes Acetylphosphat gegen t für verschiedene x/y-Kombinationen

(C) % zersetztes Acetylphosphat gegen y für verschiedene x/t-Kombinationen

Dabei wurde folgendes Ergebnis erhalten (auf eine graphische Darstellung wird hier verzichtet):

Die Kurvenscharen (A) sind für die Kombinationen aus 7,5 oder 15 U Phosphotransacetylase mit 1o oder 2o min Inkubationszeit bis ≙ 7,7 nMol CoA linear, für größeres y und/oder t nur bis 1,5 bis 3 nMol CoA.

Die Kurvenscharen (B) sind für 1,54 nMol CoA und 7,5 U Phosphotransacetylase bis 5o min linear, für größeres x und/oder y nur bis t = 2o min.
Die Kurvenscharen (C) sind i.a. nur bis 7,5 U, teilweise auch bis 15 U Phosphotransacetylase linear.

Die optimalen Werte für y und t liegen also bei 7,5 U Phosphotransacetylase (y = 1o µl bei einer Konzentration von o,75 U/µl) und t = 2o min. In Abb.21 ist die Eichgerade für den so optimierten Test dargestellt. Da sich bei dieser Testausführung aus den oben angeführten Kurvenscharen noch herauslesen läßt, daß für linearen Verlauf maximal etwa 85 % des anfänglich vorhandenen Acetylphosphats zersetzt sein dürfen, kann man aus Abb.21 berechnen, daß der Test bis ca.24 nMol CoA/Küvette linear sein sollte.

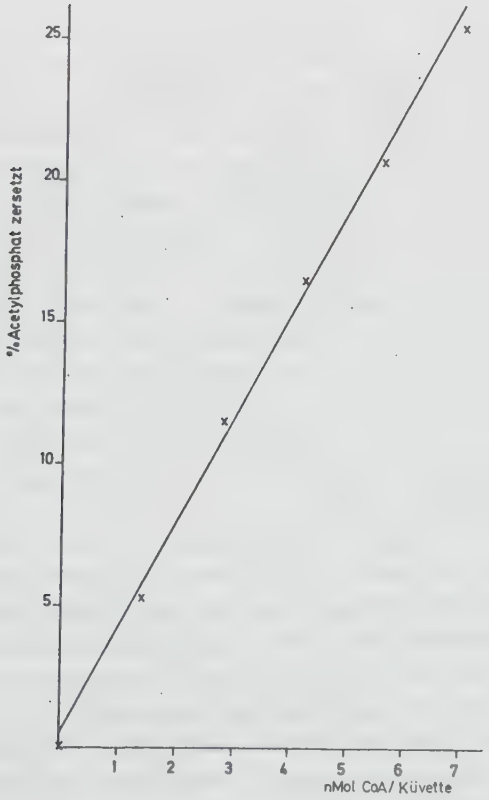


Abb.21: Eichgerade für den optimierten Test b3 (y = 1o; t = 2o)

2.5. Nichtenzymatische Bestimmungsmethoden für CoA

Für die Bestimmung von CoA können neben seiner Mitwirkung in bestimmten enzymkatalysierten Reaktionen auch seine in 2.1.2. beschriebenen Nucleotid- und Mercaptaneigenschaften herangezogen werden. Allerdings sind die darauf beruhenden Bestimmungsmethoden meist nicht spezifisch für CoA und auch weniger empfindlich als die in 2.2., 2.3. und 2.4. dargestellten enzymatischen Tests. Bei Anwesenheit verwandter Verbindungen und daher auch in biologischen Aufschlüssen sind sie i.a. nicht brauchbar.

2.5.1. Bestimmungen, die auf den Nucleotideigenschaften von CoA beruhen

a) UV-Spektren

Das heteroaromatische Adeninsystem des CoA ist Ursache für die hohe UV-Absorption mit einem Maximum bei 26o nm. Die Extinktionskoeffizienten betragen ε_{26o} = 16,4 $cm^2/\mu Mol$ (im Maximum) und ε_{232} = 5,o $cm^2/\mu Mol$ (im Minimum), so daß das theoretische E_{232}/E_{26o}-Verhältnis ca.o,3o beträgt. Sowohl E_{26o} als auch E_{232} sind allerdings vom pH der Lösung abhängig (s.Abb.22), so daß diese Beziehungen nur bei annähernd neutralem pH ausreichend gut erfüllt sind. Da außer CoA selbst, CoA-S-S-CoA und Acyl-CoA-Derivaten auch alle Bruchstücke bis herunter zum Adenin die gleiche molare Absorption bei 26o nm aufweisen, erhält man immer höhere Gehaltswerte für CoA, als sie beispielsweise mit der Endwertmethode erhalten werden (i.a. 9o bis 1oo % der eingewogenen Menge).

b) Fluoreszenzquenching (73)

Der Adeninring ist auch für das sog."Fluoreszenzquenching" (besser Fluoreszenzminderung) des CoA sowie seiner Derivate und Bruchstücke verantwortlich. Diese Eigenschaft verwendeten wir zur qualitativen Detektion von CoA auf Dünnschichtplatten: Bei Bestrahlung mit UV-Licht der Wellenlänge 254 nm ist CoA als dunkler Fleck auf fluoreszierendem Untergrund sichtbar, wenn die Platte mit Rhodamin B besprüht wurde oder die Beschichtung einen Fluoreszenzindicator enthält (Kieselgel F254 bzw. Cellu-

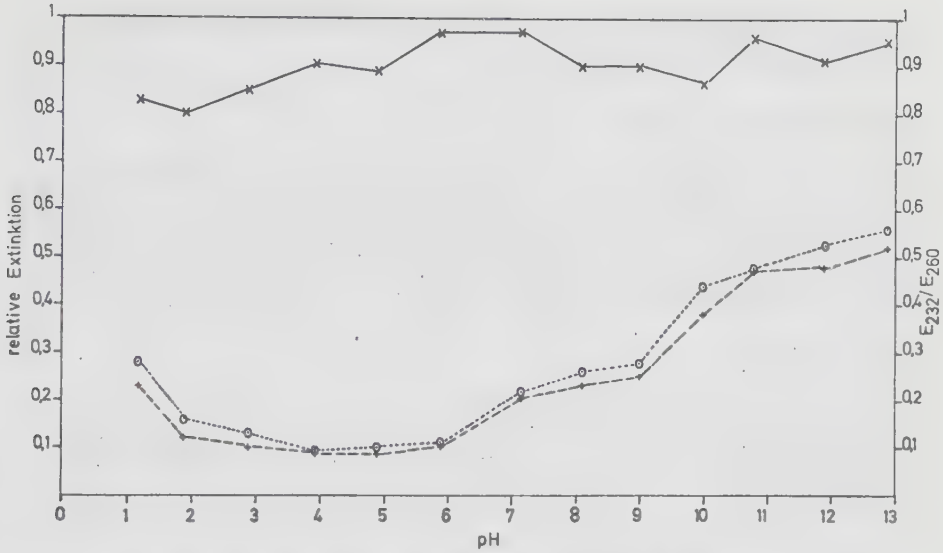


Abb.22: Einfluß des pH-Werts auf das UV-Spektrum von CoA
x—— E_{260} +--- E_{232} o····· E_{232}/E_{260}

lose F254). Die Nachweisgrenze liegt für CoA bei < o,1 µg und für ATP bei < o,o5 µg, während bei Besprühen mit dem Lipidspray nach Kägi-Miescher immerhin je o,5 µg erforderlich sind.

Die durch die Fluoreszenzlöschung erkannten CoA-Flecke können mit Wasser quantitativ eluiert und der CoA-Gehalt UV-spektroskopisch ermittelt werden; die kommerziell der Beschichtung zugesetzten Fluoreszenzindicatoren stören hierbei nicht.

In allen untersuchten Dünnschicht-Laufmitteln blieb CoA am Start liegen, so in den für die Dünnschichtchromatographie von Lipiden und LCFA-CoAs benutzten Gemischen A bis E (s.6.1.4.). Nur in Laufmittel E (≙ Butanol:Eisessig:Wasser = 5:2:3) erhielten wir ein "tailing" zwischen Rf = o und Rf = o,16. Bei Auftragung einer mit HCl angesäuerten CoA-Lösung auf HPTLC-Platten in diesem Laufmittel traten noch zwei schwach fluoreszenzlöschende Flecken bei Rf = o,42 und Rf = o,58 auf, nicht aber bei neutraler, NaOH-alkalischer, mit I_2 oder DTE versetzter CoA-Lösung.

2.5.2. Bestimmungen, die auf den Thioleigenschaften von CoA beruhen

a) Nitroprussid-Reaktion (74)

H_2S und Mercaptane, somit auch CoASH, ergeben mit Natrium-Nitroprussid $Na_2(Fe(CN)_5NO).2H_2O$ einen roten Komplex, dessen Farbe allerdings ziemlich schnell verblaßt. Die Nachweisgrenze auf Kieselgeldünnschichtplatten wurde für CoA zu 1 µg festgestellt.

b) DTNB-Methode (75)

Eine andere Bestimmungsmethode für Thiole beruht auf der Reaktion des Thiolat-Anions mit 5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoesäure) (DTNB):

(XII)

Das entstehende Anion ist resonanzstabilisiert und hat daher ein Absorptionsmaximum im Sichtbaren (gelber Bereich; Maximum bei 405 nm).

Die Nachweisgrenze auf Kieselgeldünnschichtplatten liegt für CoA bei etwa 2 µg ≙ ca.2 nMol, für die Mercapto-Aminosäure Cystein bei 0,5 µg ≙ 4 nMol. Mit der DTNB-Methode konnte u.a. der SH-Gehalt einer 200 µg/ml-CoA-Standardlösung zu 80,3 ± 7,2 % bestimmt werden, so daß sich - als Differenz zu 100 % - der CoA-S-S-CoA-Gehalt zu 19,7 % ergab; dieser Wert steht in Einklang mit dem durch den kinetischen Test mit und ohne N-Äthylmaleinimid (ohne Vorinkubation mit DTE) gefundenen CoA-Disulfid-Gehalt von 21,9 %.

2.6. Anhang: Grenzbedingungen für die Linearität des kinetischen Tests bei Eichung mit externem Standard (b4 aus Tab.5)

Um die in (67) angegebene Behauptung zu prüfen, der beschriebene kinetische Test sei nur bis 0,6 nMol ≙ ca.0,5 µg CoA/Küvette linear, wurde eine Eichkurve mit bis zu 1,4 µg CoA/Küvette aufgenommen. Das Ergebnis zeigte nicht eindeutig das erwartete Abknicken der Kurve oberhalb 0,5 µg CoA/Küvette; aber die nach

oben und unten herausfallenden Werte wurden oberhalb dieser Grenze immer häufiger. Immerhin hatte die Ausgleichsgerade aber noch einen Regressionskoeffizienten r^2 = o,9459.

Da der Grenzwert von o,5 µg CoA/Küvette somit nicht stimmen konnte, sollten nun die tatsächlichen Grenzbedingungen gefunden werden, bis zu denen noch eine exakte Proportionalität zwischen ΔE/1o min und der eingesetzten CoA-Menge erwartet werden kann. Zu diesem Zweck wurde zunächst die Abhängigkeit des Extinktionsverlaufs von der Reaktionsdauer t untersucht.

Es wurden 6 Tests mit verschiedenen zu Beginn einpipettierten CoA-Mengen angesetzt (Test 1 mit o,2 µg, Test 2 und 3 mit o,4 µg, Test 4 und 5 mit 1 µg, Test 6 mit 2 µg CoA/Küvette) und der Reaktionsverlauf bis zu einer maximalen Extinktion von o,9 bis 1,3, höchstens aber 13o min lang, verfolgt. Die E_{334}-Werte wurden alle 5 min abgelesen und sind in Abb.24 gegen die Zeit aufgetragen. Rechnet man jedes $E_{334}(t)$ (d.h.jeden E_{334}-Wert zur Zeit t (min)) auf 1 µg CoA/Küvette um, mittelt die so erhaltenen relativen Werte über alle 6 Versuchsreihen und trägt die arithmetischen Mittelwerte $\overline{E_{334}(t)}/(\mu g\ CoA/Küvette)$ gegen t(min) auf, so kann man eine exakt durch den Nullpunkt gehende Ausgleichsgerade mit dem sehr guten Regressionskoeffizienten r^2 = o,9991 errechnen, die allerdings den Nachteil hat, daß die Standardabweichungen - besonders im hinteren Teil der Kurve - recht groß sind (Abb.23). Dies muß natürlich nicht unbedingt von Abweichungen der einzelnen E-t-Kurven von der Geradenform herrühren, die wegen der Auftragung von einheitlich auf 1 µg CoA bezogenen E_{334}-Werten bei den verschiedenen Tests an verschiedenen Stellen auftreten würden und sich darum bei der Mittelwertbildung gegenseitig kompensieren könnten, sondern kann auch von Pipettierfehlern, unterschiedlichem Gehalt der Testlösungen (die Tests wurden an verschiedenen Tagen ausgeführt), oder auch von Temperaturschwankungen von Test zu Test kommen, die sich bei langen Meßzeiten natürlich besonders stark auswirken. Dagegen müssen die innerhalb eines Tests erhaltenen Werte in jedem Fall in sich konsistent sein, weswegen im folgenden die einzelnen E_{334}-t-Kurven ausgewertet werden sollen.

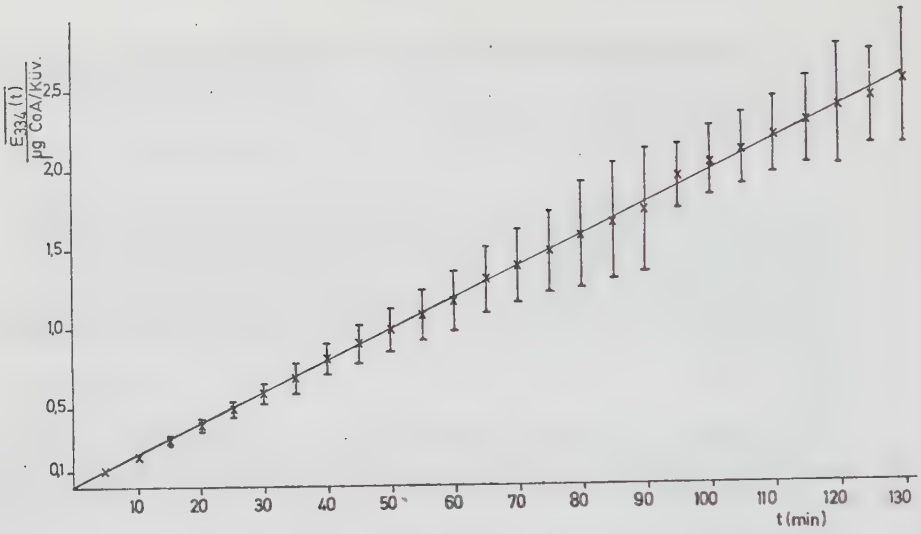


Abb.23: $\overline{E_{334}(t)}$/(µg CoA/Küvette) gegen t (min)

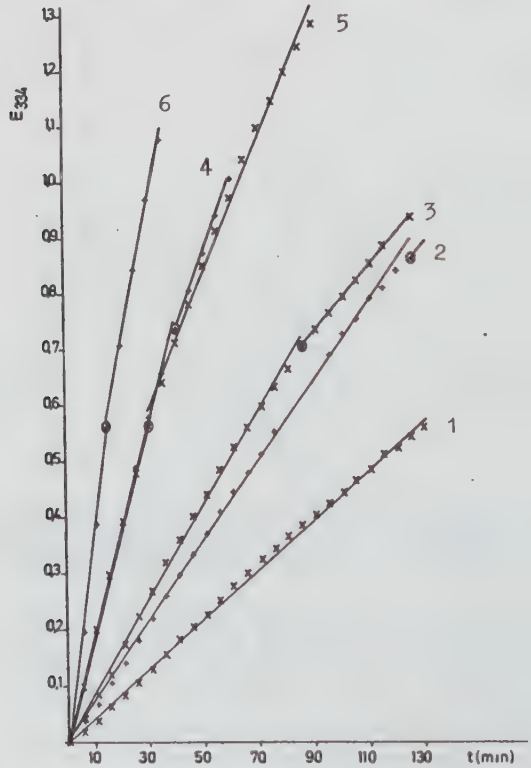


Abb.24: Abknicken der E-t-Kurven bei verschiedenen CoA-Konzentrationen (die Knickpunkte sind durch o bezeichnet)

Wie aus Abb.24 ersichtlich ist, sind die Abweichungen von der Linearität zwar gering, aber durchaus vorhanden. Um den Abknickpunkt der Kurve vom linearen Anfangsteil genau zu lokalisieren, wurden die Ausgleichsgeraden jeweils für die ersten Wertepaare (t; $E_{334}(t)$) berechnet und solange neue Wertepaare hinzugenommen, bis beim i-ten Wertepaar der Ordinatenabschnitt a_i der berechneten Geraden den Wert o,o1 überstieg (ein zwar willkürlich festgesetzter, aber noch akzeptabler Wert für eine Blindwertinkubation). Dies wurde als Kriterium für beginnendes Abknicken der E-t-Kurve genommen und die Koordinaten des zugehörigen Wertepaares als E_i (E_{334} am Abknickpunkt) und t_i (Zeit am Abknickpunkt) bezeichnet, die Steigung der aus den ersten i Punkten berechneten Ausgleichsgerade als b_i. Durch die übrigen (n-i) Punkte wurde in Abb.24 ebenfalls eine Ausgleichsgerade gezogen.

Aus den Daten der Tab.9 wird eine empirische Beziehung zwischen den Koordinaten des Abknickpunktes und der eingesetzten CoA-Menge ersichtlich. Die Beziehung lautet:

$$\text{(XIII)}\quad \frac{t_i(\text{min}) \times \text{CoA-Menge}(\mu\text{g/Küvette})}{E_i} = \text{const.} = 53{,}6$$

Da die E-t-Kurve bis zum Abknickpunkt (t_i;E_i) definitionsgemäß als linear angesehen werden kann, heißt dies nichts anderes, als daß:

$$\text{(XIV)}\quad \text{CoA-Menge } (\mu\text{g/Küvette}) = 53{,}6 \cdot \frac{\Delta E}{\Delta t} = 5{,}36 \cdot \Delta E/1o \text{ min}$$

Diese Beziehung gilt allgemein, da die Tests an ganz verschiedenen Tagen mit verschiedenen Lösungen angesetzt wurden.

Trägt man schließlich noch die Steigungen b_i der bis zum Abknickpunkt (t_i;E_i) erhaltenen Ausgleichsgeraden gegen die CoA-Menge in µg/Küvette auf (Abb.25), so erhält man tatsächlich eine sehr schöne Gerade (r^2 = o,9986), die ihrerseits eine Steigung von o,o186/µg hat; das heißt:

$$\text{(XV)}\quad \text{CoA-Menge } (\mu\text{g/Küvette}) = \frac{1}{o{,}o186} \cdot \frac{dE}{dt} = 53{,}8 \cdot \frac{dE}{dt}$$

(bereinigte Eichgerade)

Tab.9: Beziehungen zwischen eingesetzter CoA-Menge und beim Abknicken der E-t-Kurve erreichter Reaktionszeit und Gesamtextinktion (in Test 1 wurde der Abknickpunkt nicht erreicht)

	I E_i	II µg CoA/Küv.	III t_i (min)	II x III	$\frac{II \times III}{I}$
Test 1	(>0,562)	0,2	(>130)	(>26)	-
Mittelwert aus Test 2 und 3	0,784	0,4	105	42	53,6
Mittelwert aus Test 4 und 5	0,650	1	35	35	53,8
Test 6	0,563	2	15	30	53,3

Aus Tab.9 geht für die Praxis des kinetischen Tests noch hervor, daß das Ende des linearen Teils i.a. bei 0,55 bis 0,8 Extinktionseinheiten erreicht ist. Diese Extinktion wird bei 10-minütigem Reaktionsverlauf jedoch selbst bei Einsatz von 2 µg CoA/Küvette noch nicht erreicht, so daß der Knickpunkt bei Eichung mit externem Standard meist keine Bedeutung hat (s.aber die Messung mit internem Standard in 2.3.5.).

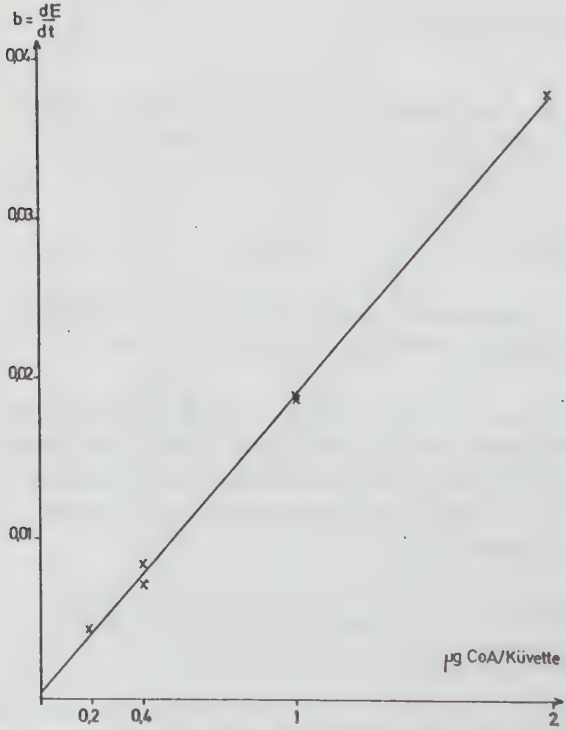


Abb.25: bereinigte Eichgerade für Test b4 nach Gleichung (XV)

3. LCFA-CoA-Verbindungen

3.1. Allgemeines

3.1.1. Einleitung

Bei den langkettigen Fettsäure-Acyl-Coenzym-A-Verbindungen (LCFA-CoAs) liegt eine Thiolesterbindung zwischen der Thiolgruppe im Cysteaminanteil des CoA (s.Abb.3) und der Carboxylgruppe einer langkettigen Fettsäure vor. Im allgemeinen wird eine Kettenlänge von 12 bis 24 C-Atomen angenommen; die Fettsäuren sind unverzweigt, können aber gesättigt oder ein- bis mehrfach ungesättigt sein. Das Molekulargewicht liegt - je nach Acylrest - zwischen 95o und 1118 Dalton; das meist von uns verwendete Palmityl-CoA (PCoA) hat ein Molekulargewicht von 1oo6 Dalton (Summenformel $C_{37}H_{66}O_{17}N_7P_3S$

3.1.2. Eigenschaften

Einige Eigenschaften der LCFA-CoAs, soweit sie in den im CoA-Anteil enthaltenen funktionellen Gruppen ihre Ursache haben, stimmen weitgehend mit denen der Grundverbindung CoA überein. Die Thioleigenschaften und damit auch die typischen enzymkatalysierten Reaktionen des CoAs, die ja auf der Acylierung und Deacylierung der Thiolgruppe beruhen, sind verschwunden und tauchen erst nach Spaltung der Thiolesterbindung wieder auf. Weitere Eigenschaften, die von den Fettsäureresten herrühren und daher von Kettenlänge und Sättigungsgrad des Acylrestes abhängen, kommen hinzu.

a) Nucleotideigenschaften
(bedingt durch das Adenin)

LCFA-CoAs haben, genau wie CoA, eine ausgeprägte UV-Absorptionsbande mit einem Maximum bei 26o nm, das jedoch meist um 1 bis 2 nm zu niedrigeren Wellenlängen verschoben ist. Wegen der ausgeprägten Micelleneigenschaften (s.d)) ist ε_{26o} nicht nur vom pH, sondern auch von der Konzentration abhängig; nach (76) kann ein richtiges E_{26o} nur bei einer PCoA-Konzentration $<$ 6 µM und bei Zusatz von 3o % Methanol (in 1 M KCl und 2 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 6,9) bestimmt werden.

Wie bei CoA, so kann auch bei LCFA-CoAs die Fluoreszenzlöschung als qualitatives Nachweismittel benutzt werden.

b) Säureeigenschaften
(bedingt durch die Phosphatgruppen)

Auch die Säureeigenschaften bestehen nach Acylierung der SH-Gruppe unverändert fort, weil am Rest des CoA-Moleküls ja nichts verändert wurde.

c) Thiolestereigenschaften

Die Thiolestergruppierung ist Ursache für eine weitere UV-Bande bei 232 nm, die sich der Adeninbande in der Nähe ihres Absorptionsminimums überlagert, was die in a) beschriebene leichte hypsochrome Verschiebung des Absorptionsmaximums erklärt. Nach (77) sind die Extinktionskoeffizienten $\varepsilon_{260} = 16{,}4 \times 10^6$ cm^2/Mol und $\varepsilon_{232} = 9{,}4 \times 10^6$ cm^2/Mol, so daß das theoretische E_{232}/E_{260}-Verhältnis ca.0,57 beträgt. Bei Acylierung mit α,ß-ungesättigten Säuren, ß-Ketosäuren, Benzoesäure u.ä. treten weitere UV-Banden auf.

LCFA-CoAs besitzen keine freie Thiolgruppe mehr, so daß weder SH-Blockierung durch Iodessigsäure oder andere in 2.1.2. angeführte Agentien noch Oxidation zum Disulfid erfolgen kann. Mercaptide werden jedoch gebildet, da die Thiolesterbindung durch Einwirkung von Hg^{2+}-Salzen (z.B.Quecksilber(II)-Acetat) gespalten wird.

Wie Acylphosphate reagieren auch Acyl-CoAs mit Hydroxylamin zu Hydroxamsäuren (s.2.4.1.); im Gegensatz zur Acyl-Phosphat-Bindung ist die Acyl-Mercaptan-Bindung hitzestabil, auch bei saurem pH (vgl.2.4.2.). In verdünntem Alkali und durch Thioesterase-Einwirkung wird sie jedoch unter Freisetzung von CoASH und der freien Fettsäure gespalten; das CoASH kann dann enzymatisch oder auch mit der Nitroprussid- oder DTNB-Methode bestimmt werden; die Fettsäure kann aufgrund ihrer Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln abgetrennt und - sofern sie radioaktiv markiert war - die Radioaktivität gemessen werden.

Die Thiolesterbande bei 232 nm verschwindet während der Spaltung, so daß die Bestimmung auch durch Aufnahme eines "Differenz-

spektrums" erfolgen kann, d.h. durch Subtraktion der vor und nach der Spaltung gemessenen UV-Absorptionen.

d) Eigenschaften, die auf dem Fettsäureanteil beruhen

Im Gegensatz zu CoA, das eine rein hydrophile Verbindung ist, hat ein LCFA-CoA-Molekül einen langen ungeladenen, hydrophoben Acylrest auf der einen Seite und einen voluminösen, negativ geladenen, hydrophilen CoA-Rest auf der anderen Seite. Dies entspricht im wesentlichen dem Molekülaufbau der meisten Phospholipide. Daher sind LCFA-CoAs wie Phospholipide in vielen organischen Lösungsmitteln mittlerer Polarität gut löslich. In Wasser bilden sie Micellen mit einem Micellengewicht von 1 bis 85×10^6 Dalton; die CMC liegt etwa bei 3 bis 4 µM (76). Die Detergenseigenschaften wurden bereits in der Einleitung erwähnt (s.1.).

Auch oberflächenaktive Eigenschaften fallen ins Gewicht: Bei einer PCoA-Konzentration von 3 µM in Wasser - also in der Nähe der CMC - werden nach (78) o,23 nMol PCoA/cm^2 an der Luft-Flüssigkeit-Grenzschicht absorbiert; in der Stammphase muß daher ein beträchtlicher Konzentrationsverlust in Kauf genommen werden, wenn das Oberflächen-Volumen-Verhältnis über o,5 cm^2/ml steigt.

Im Gegensatz zu CoA sind LCFA-CoAs in verdünnter Perchlorsäure nicht löslich, was bei dem in Kapitel 4. beschriebenen $HClO_4$-Aufschluß zu ihrer Abtrennung verwendet wird.

Auch die dünnschichtchromatographischen Eigenschaften der LCFA-CoAs ähneln teilweise denen der Phospholipide (Laufmittelsysteme, Rf-Werte, Sprühmittel für die Detektion), ebenso die säulenchromatographischen Eigenschaften.

3.2. Bestimmungsmethoden ohne Spaltung der Thioesterbindung

3.2.1. Enzymatische Bestimmung

Der bisher einzige enzymatische Test für LCFA-CoAs, der ohne Spaltung der Thioesterbindung auskommt, wurde von P.K.Tubbs und P.B.Garland angegeben (79). Die durch das Enzym langkettige-Fett-

säure-Acyl-CoA-Dehydrogenase katalysierte Oxidation der LCFA-CoA-Verbindung wird mit der spektroskopisch leicht verfolgbaren Reduktion von Cytochrom c gekoppelt:

(XVI) $R\text{-}CH_2\text{-}CH_2\text{-}COSCoA + 2\ \text{Cytochrom c}\ (Fe^{3+}) =$
$= R\text{-}CH{=}CH\text{-}COSCoA + 2\ \text{Cytochrom c}\ (Fe^{2+}) + 2\ H^+$

Als Elektronencarrier wird dabei Phenazinmethosulfat benutzt.

Mit diesem Test werden natürlich nur Derivate erfaßt, die an den C-Atomen 2 und 3 des Fettsäurerestes gesättigt sind; diese Bedingung erfüllen allerdings fast alle natürlich vorkommenden LCFA-CoA-Spezies. Der Test ist empfindlich; jedoch muß bei biologischem Material LCFA-CoA zuerst extrahiert werden, was sehr umständlich ist und zu Komplikationen führt. Daher wurde dieser Test von uns nicht verwendet.

3.2.2. Spektroskopische Charakterisierung (IR, UV)

Im IR-Spektrum der LCFA-CoAs tritt - wie bei allen Thioestern - eine C-S-Streckschwingung bei 9 µm auf.

Die UV-spektroskopischen Eigenschaften wurden teilweise schon in Kapitel 3.1.2. besprochen; dort sind auch die molaren Extinktionskoeffizienten bei 232 und 26o nm angegeben. Die Extinktion bei 26o nm ist lediglich ein Maß für die Gesamtkonzentration an Verbindungen, die den Adeninbicyclus enthalten, also nicht nur für die Konzentration an Acyl-CoA, sondern auch an S-Acyl-3'-Dephospho-CoA, CoASH, CoA-S-S-CoA, 3'-Dephospho-CoA und anderen CoA-Bruchstücken bis hinunter zu ADP, AMP, Adenosin und Adenin. In pyridinhaltigen Lösungen, wie sie bei uns wegen der Verwendung des Extraktionsmittels E2 (s.2.3.6.a)) häufig auftraten, stören zusätzlich noch die vier Absorptionsgipfel bei den Wellenlängen 245, 251, 257 und 263 nm.

Zur eindeutigen Charakterisierung der LCFA-CoAs - insbesondere zur Unterscheidung von CoA - können die Quotienten aus den bei verschiedenen Wellenlängen gemessenen Extinktionen dienen; dabei ist allerdings zu berücksichtigen, daß das UV-Spektrum konzentrations- und pH-abhängig ist und daß in alkalischem Milieu eine

hydrolytische Spaltung der Thioesterbindung eintritt, was ein Absinken von E_{232} zur Folge hat. In (69) wird empfohlen, die Verhältnisse der Extinktionen bei 232, 25o und 28o nm zu der maximalen Extinktion bei 26o nm als Kriterium für die Reinheitsprüfung heranzuziehen; die Sollwerte für diese Quotienten sind in Tab.1o angegeben. Zum Vergleich werden in dieser Tabelle noch die von uns gemessenen UV-spektroskopischen Daten einiger Lösungen von CoA-Derivaten - teilweise frisch (Gruppe I) und teilweise infolge längerer Lagerung zersetzt (Gruppe II) - sowie von CoA selbst, angeführt.

Aus Tab.1o wird ersichtlich, daß für die Entscheidung, ob das Acyl-CoA-Präparat schon zersetzt ist oder nicht, die Bestimmung des Quotienten E_{232}/E_{26o} ausreicht. E_{232}/E_{26o} ist ein Maß für die Reinheit des Acyl-CoA-Präparats: Nähert sich der Quotient dem Wert o,3o, so liegt der größte Teil als CoA (oder dessen Bruchstücke) vor, d.h.das Präparat ist weitgehend zersetzt. Liegt der Quotient näher bei o,57, so liegt wahrscheinlich ziemlich reines Acyl-CoA vor; allenfalls die primäre 3'-Phosphatgruppe kann abhydrolysiert sein (S-Acyl-3'-Dephospho-CoA).

E_{25o} und E_{28o} sind meist nur ungenau zu bestimmen, da die Absorptionskurve gerade in diesen Bereichen besonders stark abfällt. Die Bestimmung von E_{25o}/E_{26o} und von E_{28o}/E_{26o} ist auch nur von geringer Aussagekraft: E_{25o}/E_{26o} ist für CoA (und zersetzte Acyl-CoAs) nur wenig kleiner als für die intakte Verbindung, während bei E_{28o}/E_{26o} sogar überhaupt kein Unterschied zu sehen ist. Dies ist auch ohne weiteres verständlich, weil ja oberhalb der maximalen Absorption bei 26o nm keine weitere absorbierende Gruppe mehr vorhanden ist.

3.2.3. Papier- und dünnschichtchromatographisches Verhalten

Die in der Literatur beschriebenen papier- und dünnschichtchromatographischen Daten sind für PCoA in Tab.11 zusammengestellt. Die Detektion erfolgte, soweit angegeben, durch Aufnahme des UV-Spektrums nach Elution (bei Papierchromatographie), durch Sichtbarmachung mit Ioddampf oder durch Scannen bei radioaktiv markiertem Acylrest.

Tab.1o: Charakteristika der UV-Spektren von CoA und verschiedenen Acyl-CoA-Verbindungen
(den Werten von (69) liegt ein molarer Extinktionskoeffizient ε_{26o} = 15,4x1o^6 cm^2/Mol, den Werten von (77) ein ε_{26o} = 16,4x1o^6 cm^2/Mol zugrunde)

	E_{26o}	E_{232}	E_{25o}	E_{28o}	E_{232}/E_{26o}	E_{25o}/E_{26o}	E_{28o}/E_{26o}
theoretisch(77)	-	-	-	-	o,57	-	-
gemessen(77)	-	-	-	-	o,52-o,62	-	-
theoretisch(69)	-	-	-	-	o,55	o,87	o,18
gemessen(69)	-	-	-	-	o,55±o,o3	o,87±o,o3	o,18±o,o2
Gruppe I: intakte Acyl-CoAs							
Propionyl-CoA	o,31	o,17	o,27	o,o6	o,55	o,87	o,19
Butyryl-CoA	o,23	o,13	o,2o	o,o3	o,56	o,87	o,13
Capronyl-CoA	o,62	o,37	o,55	o,11	o,6o	o,89	o,18
PCoA	o,8o	o,48	o,69	o,18	o,6o	o,86	o,23
1-^{14}C-PCoA	o,63	o,32	o,53	o,12	o,51	o,84	o,19
Stearyl-CoA	o,49	o,28	o,44	o,11	o,57	o,9o	o,22
Mittelwerte Gruppe I	-	-	-	-	o,57±o,o3	o,87±o,o2	o,19±o,o4
Gruppe II: CoA und zersetzte Acyl-CoAs							
CoA	o,98	o,24	o,78	o,18	o,24	o,8o	o,18
$HClO_4$-Überstand aus PCoA-Herstellung nach (8o)	1,o2	o,27	o,84	o,18	o,26	o,82	o,18
Propionyl-CoA, zersetzt	o,41	o,12	o,36	o,o7	o,29	o,88	o,17
Malonyl-CoA, zersetzt	o,66	o,22	o,57	o,13	o,33	o,86	o,2o
Mittelwerte Gruppe II	-	-	-	-	o,28±o,o4	o,84±o,o4	o,18±o,o1

In Tab.12 werden einige von uns ermittelte Rf-Werte für PCoA in verschiedenen Dünnschichtsystemen angegeben. Es wurde unmarkiertes, 1-^{14}C- oder 9,1o-^{3}H-PCoA verwendet. Auf Platten mit Kieselgur-Konzentrierungszone wandert PCoA in Laufmittel B bis unmittelbar hinter die Kieselgur-Kieselgel-Grenzschicht.

Tab.11: Papier- und dünnschichtchromatographische Daten von PCoA (Literaturwerte)
Zusammensetzung der Laufmittel s.6.1.4.

Literatur	Papiersorte bzw. Beschichtung	Laufmittel	Rf
I.Papierchromatographie			
(81)	-	F	o,6-o,75
(82,84)	Whatman 3MM	G	o,65-o,8*
(18)	Whatman 1	H	o,33
(78)	Whatman 1	E	o,56
II.Dünnschichtchromatographie			
(85)	Kieselgel	B	Start
(86)	Kieselgel	I	Start
(87)	Cellulose	E	o,68
(88)	Kieselgel	J, K	Start
(89)	Kieselgel	D	o,25
(4o)	Kieselgel	C	o,34

*Für CoA-SH und CoA-S-S-CoA wird in Laufmittel G ein Rf-Wert zwischen o,33 und o,47 angegeben.

Tab.12: Dünnschichtchromatographische Daten von PCoA (eigene Werte)

Beschichtung	Laufmittel	Rf
Kieselgel	A	o,oo
Kieselgel	B	o,o1
HPTLC	C	o,29
Cellulose	E	o,58
Kieselgel	E	o,69
HPTLC	E	o,56
Kieselgel	L	o,55
Kieselgel	M	o,41
Kieselgel	N	o,o2
Kieselgel	O	o,o2
HPTLC	P	o,oo

Die beiden Laufmittel L und N sind wegen des NH_3-Gehalts alkalisch. Läßt man eine Lösung von PCoA in diesen Laufmitteln etwa 1 bis 3 h bei Raumtemperatur stehen, so tritt daher vollständige Hydrolyse der Thioesterbindung ein. Nach unseren Beobachtungen wurde während der dünnschichtchromatographischen Auftrennung jedoch PCoA in Laufmittel L nur teilweise zersetzt, in Laufmittel N überhaupt nicht.

Wie CoA, so lassen sich auch LCFA-CoAs auf Dünnschichtplatten durch die Fluoreszenzlöschung bei 254 nm nachweisen (Besprühen mit Rhodamin B oder Verwendung von Platten mit Fluoreszenzindicator; Nachweisgrenze < o,o36 µg PCoA) oder durch Besprühen mit dem meist für Lipide verwendeten Kägi-Miescher-Spray sichtbar machen (Nachweisgrenze < 3,6 µg PCoA; zum Vergleich: < 1 µg Phosphatidylcholin). Eine Anfärbung der PCoA-Flecke mit dem Zuckerphosphatreagens nach (9o) oder mit Phosphomolybdänsäure-Spray konnte von uns nicht beobachtet werden.

Zusätzlich besteht noch die Möglichkeit, entweder den CoA- oder den Fettsäureanteil des LCFA-CoA-Moleküls radioaktiv zu markieren und den Fleck mit Hilfe des Dünnschichtscanners zu lokalisieren; die Nachweisgrenze hängt hier natürlich von der spezifischen Radioaktivität ab. In Abb.26 und 27 ist die Radioaktivitätsverteilung auf einer kieselgelbeschichteten Polygram-Folie nach Entwicklung von 1-^{14}C- bzw. 9,1o-^{3}H-PCoA in Laufmittel E dargestellt (vgl.6.1.3.).

Die allgemein nach (91) bei der Dünnschichtchromatographie zu beachtenden Punkte seien speziell für unsere Trennprobleme diskutiert:

1) Carrier:

Bei Auftragung sehr kleiner Mengen können Abweichungen vom normalen chromatographischen Verhalten auftreten. Bei Verwendung von radioaktiv markierten LCFA-CoAs ist daher darauf zu achten, daß die aufgetragene Menge ausreichend ist (≙ o,o5 µg; das entspricht etwa der kleinsten durch Fluoreszenzlöschung nachweisbaren PCoA-Menge); evtl. muß noch unmarkierter Carrier zugesetzt werden.

2) Temperatur:

Es kann nicht jedes Lösungsmittelgemisch bei jeder Temperatur

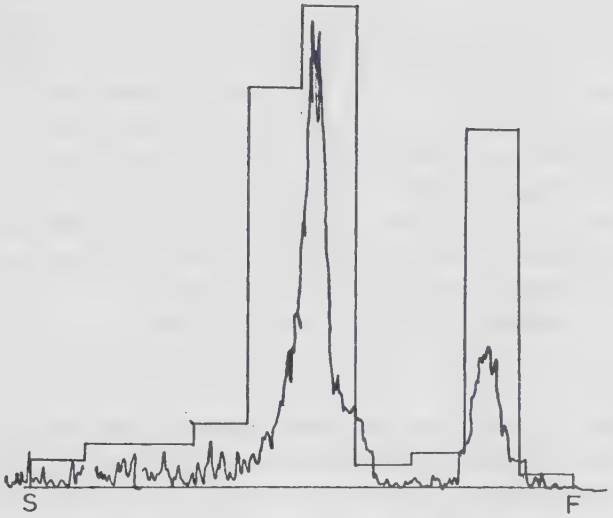


Abb.26: Dünnschichtchromatographie von 1-^{14}C-PCoA in Laufmittel E auf Polygramfolie
Dünnschichtscanner-Diagramm verglichen mit dpm pro ΔRf = o,1
(S ≙ Start, F ≙ Front)

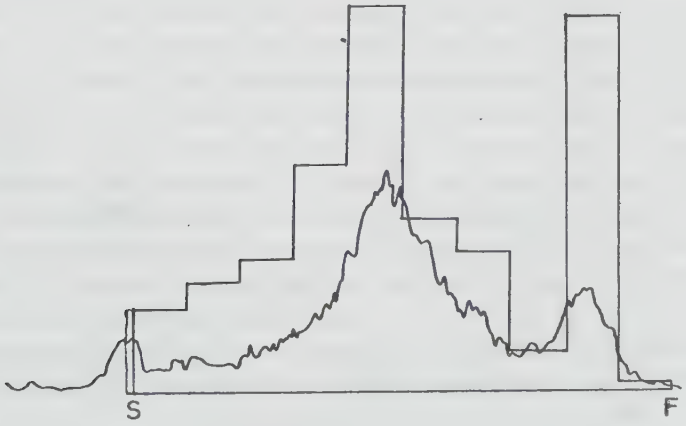


Abb.27: Dünnschichtchromatographie von 9,1o-^{3}H-PCoA in Laufmittel E auf Polygramfolie
Dünnschichtscanner-Diagramm verglichen mit dpm pro ΔRf = o,1
(S ≙ Start, F ≙ Front)

verwendet werden; insbesondere tritt bei Butanol-Eisessig-Wasser-Gemischen etwa bei 2°C Phasentrennung ein. Bei Raumtemperatur sind die Gemische Butanol:Eisessig:Wasser = 5:2:3 (Laufmittel E; (87)) und = 3:1:1 (92) zwar einphasig; jedoch tritt auf Cellulose- und Kieselgelplatten bei Dünnschichtchromatographie in diesen Laufmitteln eine ß-Front auf, die sich durch die verschieden starke Anfärbbarkeit der oberen und der unteren Hälfte der Platte mit verschiedenen Sprühreagenzien deutlich nachweisen läßt. Die wechselnde relative Lage dieser ß-Front kann die Rf-Werte mehrerer Verbindungen stark beeinflussen.

3) Temperaturkonstanz:
Die Forderung nach Temperaturkonstanz während der gesamten Chromatographiedauer ist für Butanol-Eisessig-Wasser-Mischungen wegen der langen Laufzeiten (5 bis 8 h) nur schwer zu erfüllen; aus diesem Grund wurden bevorzugt die schnellaufenden und trotzdem hochauflösenden HPTLC-Platten verwendet (Laufzeit ca.3o min).

4) Kammeratmosphärensättigung mit Lösungsmitteldampf:
Bei unseren Systemen hatte dieser Faktor kaum Auswirkungen auf die Reproduzierbarkeit einer Trennung (siehe aber das Kapitel 5.1.3. über zweidimensionale HPTLC).

5) Änderung der Lösungsmittelzusammensetzung:
Dieser Faktor spielt besonders bei Gemischen mit leichtflüchtigen Komponenten eine Rolle, z.B.bei Petroläther-Äther-Eisessig- und Chloroform-Methanol-Wasser-Gemischen. Bei Butanol-Eisessig-Wasser-Gemischen tritt allmählich Veresterung zu Essigsäurebutylester ein; nach 1 Tag Stehenlassen bei Raumtemperatur konnten wir allerdings noch keine Änderung von Rf-Werten beobachten.

6) Schichteigenschaften:
Einflüsse von Schichtdicke, Binder und Vorbehandlung der Platten wurden weitgehend eliminiert, indem wir, soweit möglich, authentische Vergleichssubstanzen auf derselben Platte mitlaufen ließen. Wir verzichteten weitgehend auf vorherige Aktivierung im Trockenschrank und Exsiccator, da in einem Kontrollversuch kein wesentlicher Einfluß der Aktivierung auf den Verlauf der chromatographischen Trennung beobachtet wurde.

3.3. Bestimmungsmethoden mit Spaltung der Thioesterbindung

3.3.1. Alkalische Hydrolyse der Thioesterbindung mit anschließender enzymatischer Bestimmung des freigesetzten CoA

Die meisten Verfahren zur Bestimmung von LCFA-CoA-Verbindungen setzen Acyl-CoA nicht direkt um (wie der in 3.2.1. beschriebene Test mit LCFA-CoA-Dehydrogenase), sondern setzen zunächst durch enzymatische oder alkalische Hydrolyse der Thioesterbindung das darin enthaltene CoA frei, das dann mittels einer der in Kapitel 2. beschriebenen enzymatischen oder nichtenzymatischen Methoden bestimmt werden kann.

Am einfachsten erscheint zunächst die Spaltung der Thioesterbindung durch verdünntes Alkali nach folgender Gleichung:

(XVII) $R\text{-}COSCoA + OH^- = R\text{-}COO^- + CoASH$

Nach vollständiger Hydrolyse kann neutralisiert und mit einem der in Kapitel 2.2., 2.3. oder 2.4. beschriebenen Tests der CoA-Gehalt bestimmt werden. Auch die Kombination der alkalischen Hydrolyse mit den Tests b2, a1 und a2 aus Tab.5 wurde beschrieben (93,79,17).

Nachteile dieses Verfahrens sind, daß die alkalische Hydrolyse nicht spezifisch für LCFA-CoAs ist und daß von vornherein vorhandenes freies CoA mitgemessen wird. Bei biologischem Material bildet sich in dem meist angewandten pH-Bereich 11-11,5, der für rasche vollständige Hydrolyse erforderlich ist, ein schwierig zu handhabendes gelatinöses Homogenat; bei noch höheren pH-Werten, die dieses Homogenat wieder verflüssigen würden, tritt Abbau des CoA auf.

Wegen dieser Nachteile muß der Test i.a. mit einem Säureaufschluß kombiniert werden, der auf der weitgehenden Unlöslichkeit von LCFA-CoAs in verdünnter $HClO_4$ beruht und in Kapitel 4. ausführlich beschrieben werden soll. Es ist offensichtlich, daß auch hier wieder mannigfache neue Schwierigkeiten auftreten: Einfluß von Menge, Konzentration, Temperatur der $HClO_4$, unvoll-

ständige Fällung der LCFA-CoAs in Abhängigkeit von Kettenlänge und Sättigungsgrad, unvollständige Abtrennung von CoA, unvollständige Verseifung und unvollständige Extraktion des bei der Verseifung gebildeten CoA aus dem $HClO_4$-Niederschlag, Einfluß des Neutralisationsmittels, Störung von Ionen und Metaboliten im anschließenden CoA-Test.

Ohne Anwendung eines Säureaufschlusses erfolgversprechend erschien der Test nur für relativ reine LCFA-CoA-Lösungen. Es mußte zunächst die Einwirkung von OH^--Ionen auf CoA selbst untersucht werden; diese Frage ist in 2.3.3. noch nicht behandelt worden. Es wurde meist der folgende oder ein analoger Testansatz verwendet:

x nMol CoA oder PCoA
evtl.4 µMol DTT
400 µMol KOH

Diese "Verseifungsmischung" (Volumen: 0,4 ml; Konzentration: 1 N KOH, evtl. 10 mM DTT) wurde verschieden lange (1 bis 60 min) bei verschiedenen Temperaturen (0°, 25°, 30°, 37°C) inkubiert. Dann wurde die Reaktion abgestoppt:

400 µMol HCl
220 µMol Kaliumphosphat-Puffer pH 6,0

Ein Aliquot der neutralisierten und mit Puffer aufgefüllten "Verseifungsmischung" (Volumen: 3,0 ml) wurde sodann in den Ansatz für den kinetischen Test einpipettiert (Test b4 aus Tab.5,s.2.3.2.).

In Abb.28 und 29 sind einige typische "Verseifungskurven" wiedergegeben. Die Konzentrationen beziehen sich auf die Verseifungsmischung vor dem Abstoppen; die CoA-Konzentrationen wurden mit Test a5 aus Tab.5 gemessen, die PCoA-Konzentrationen (einschließlich des als Verunreinigung enthaltenen CoAs) aus der Extinktion bei 260 nm bestimmt. Im einzelnen wurden bei 30°C inkubiert:

a) 74 µM CoA in 1 N KOH (ohne DTT-Zusatz) (Abb.28)
b) 37 µM CoA in 1 N KOH und 10 mM DTT (Abb.28)
c) 183 µM PCoA in 1 N KOH und 10 mM DTT (Abb.28)
d) 354 µM PCoA in 807 mM KOH und 13,3 mM DTT (Abb.29)

Zu jeder Kurve wurden 2 Bezugswerte gemessen (bei beiden ist die Inkubationszeit gleich Null):

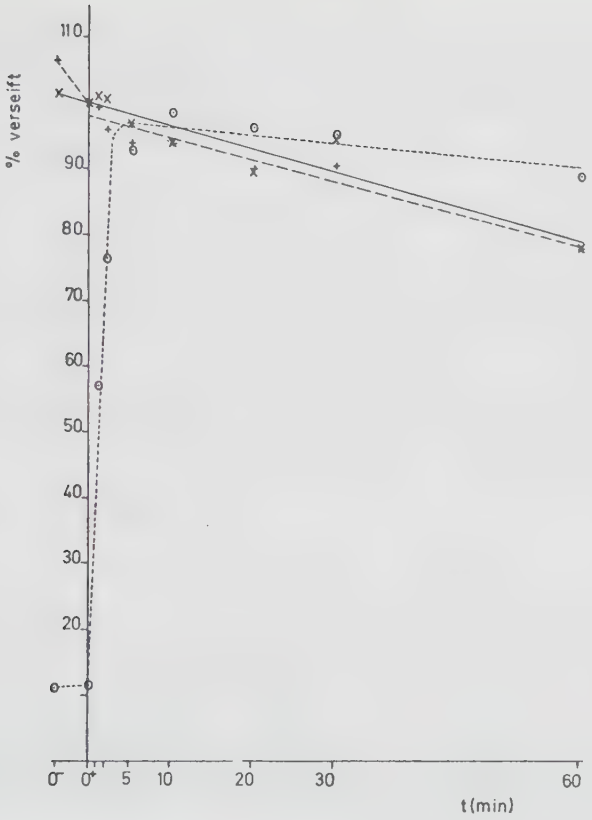


Abb.28: Inkubation von CoA und PCoA in 1 N KOH (mit und ohne DTT) bei 3o°C - Messung des freigesetzten CoA mit Test b4 (Jeder Punkt ist arithmetisches Mittel aus 3 Werten. Der Übersichtlichkeit halber sind die Fehlergrenzen weggelassen worden; vgl.Tab.19)
x——— a) 74 µM CoA, 1 N KOH
+---- b) 37 µM CoA, 1 N KOH, 1o mM DTT
o------ c)183 µM PCoA,1 N KOH, 1o mM DTT

O- ≙ CoA (PCoA) + Puffer

O+ ≙ CoA (PCoA) + Puffer + DTT + HCl + KOH (in dieser Reihenfolge zusammengeben, damit eine Verseifung auf keinen Fall stattfinden kann)

Wegen der höheren Ionenkonzentration ist der kleinere Wert immer O+ (Hemmung der am kinetischen Test beteiligten Enzyme, s.2.3.4.).

Für die "Pseudo-Verseifungskurven", d.h.also für die Inkubation von CoA in KOH mit oder ohne DTT (Kurven a) und b)), ist O+ der

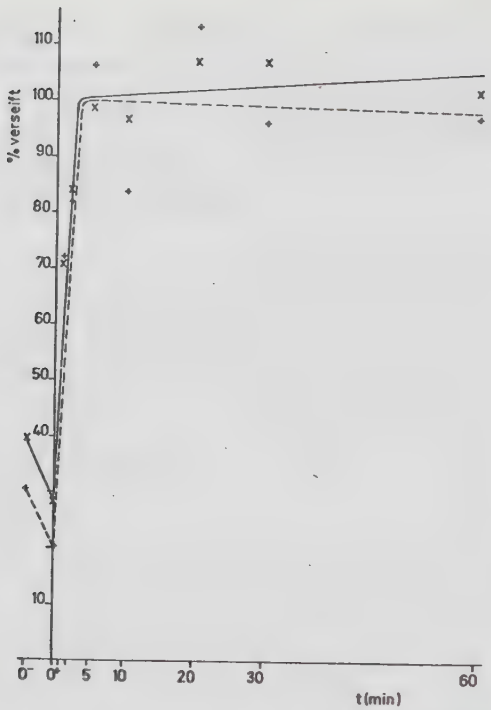


Abb.29: Vergleich zwischen dem mit externem und mit internem CoA-Standard berechneten Verlauf der Verseifung von 354 µM PCoA in 8o7 mM KOH und 13,3 mM DTT bei 3o°C (Test b4)
x——— d) externer Standard
+---- d) interner Standard (1 µg)

Ausgangs- und Bezugspunkt für alle folgenden Punkte der Kurven und wurde in Abb.28 gleich 1oo % gesetzt. Die Abnahme folgt angenähert einer Geradengleichung und ist offensichtlich von der An- oder Abwesenheit von DTT unabhängig; sie beträgt etwa 1o bis 2o % in 6o min.

In Kurve c), also bei der eigentlichen PCoA-Verseifung, ist der Wert O+ natürlich kein Bezugspunkt, sondern entspricht lediglich der von vornherein im PCoA-Präparat enthaltenen CoA-Menge. (Wegen der Hemmung der Enzyme Citratsynthase und Malat-Dehydrogenase durch PCoA gilt die Entsprechung allerdings nicht genau.) In den ersten 2 bis 5 min der Verseifung steigt der CoA-Gehalt sehr rasch an, erreicht bei etwa 5 bis 1o min ein Maximum und fällt dann allmählich wieder ab; dieser Abfall entspricht voll-

kommen der "Pseudo-Verseifungskurve" für CoA. Der in Abb.28 zu sehende geringe Unterschied zwischen den linearen Zweigen der Kurve c) einerseits und den Kurven a) und b) andererseits erwies sich als statistisch nicht signifikant.

Man kann nun auf den Gesamt-CoA-Gehalt zur Zeit t = o zurückschließen, indem man aus den von t = 5 bis t = 6o min - also nach Erreichen des Maximums - gemessenen Punkten die Ausgleichsgerade berechnet und sie bis zum Schnittpunkt mit der Ordinate zurückverlängert. Der so erhaltene Wert x(t=o) wurde in Abb.28 und 29 ebenfalls gleich 1oo % gesetzt, um alle Verseifungskurven in einem Diagramm zusammen darstellen zu können. Die Differenz x(t=o) - (O+) entspricht schließlich der gesuchten PCoA-Konzentration (ohne endogenes CoA) bzw. dem Gehalt an PCoA in % der Gesamt-CoA-Konzentration.

Eicht man - entsprechend 2.3.5. - mit internem CoA-Standard, so werden absolute Werte für die PCoA-Konzentration erhalten. Die Wiederfindung an Gesamt-CoA betrug in dem in Abb.29 dargestellten Versuch o,8o45 mM ≙ 75,8 % der aus der Extinktion bei 26o nm berechneten Konzentration (1,o61 mM). Die Form der Verseifungskurve ändert sich durch die veränderte Berechnungsweise nicht (s.Abb.29).

Im Prinzip kann der gesamte oben beschriebene LCFA-CoA-Test auch in einer Küvette ausgeführt werden; dadurch wird die Empfindlichkeit gesteigert, da die Aliquotentnahme wegfällt. Eine auf diese Weise aufgenommene "Pseudo-Verseifungskurve" für 8,7 µM CoA in ca.1 N KOH bei 25°C (ohne DTT-Zusatz) war im wesentlichen mit den Kurven a) und b) in Abb.28 identisch. In der Praxis scheitert eine Bestimmung absoluter Werte mit internem CoA-Standard jedoch meist daran, daß die in 2.3.5. angegebene Grenzbedingung für ΔE nicht erfüllt wird. Dies ist eine Folge der in der Küvette vorhandenen hohen Ionenkonzentration, die sich aber wegen der Notwendigkeit einer raschen und vollständigen alkalischen Hydrolyse nicht vermeiden läßt.

3.3.2. Enzymatische Hydrolyse der Thioesterbindung mit anschließender enzymatischer Bestimmung des freigesetzten CoA

Außer durch verdünntes Alkali kann die Thioesterbindung auch enzymatisch mittels Einwirkung von Thioesterasen gespalten werden. In der Literatur werden mehrere Enzyme beschrieben, die Thioesteraseaktivität als Haupt- oder Nebenaktivität entfalten:

Fettsäuresynthetase aus Taubenleber (94)

Fettsäuresynthetase aus Rattenleber (95)

PCoA-Deacylase aus Schweinehirn (55)

Palmitylthioesterasen I und II aus Escherichia coli (96,97): Enzym I spaltet Acyl-CoAs ab einer Kettenlänge von 1o C-Atomen, Enzym II Acyl-CoAs mit 6 bis 18 C-Atomen; maximale Aktivität für 16:o ≙ PCoA

Pankreas-Lipase (98)

Auch Acyltransferasen sind brauchbar; bei ihnen wird zwar keine Fettsäure, aber wenigstens das CoA freigesetzt, das dann enzymatischer oder nichtenzymatischer Bestimmung zugänglich ist:

Carnitin-Acetyltransferase (99)

Carnitin-Palmityltransferase (5o)

J.F.A.Chase (99) beschreibt einen Test mit Carnitin-Acetyltransferase, die außer aus Acetyl-CoA auch aus anderen Acyl-CoA-Verbindungen, allerdings nur bis zu einer Kettenlänge von 1o C-Atomen, CoA freisetzt, das dann mit der DTNB-Methode oder durch Ankopplung der α-Ketoglutarat-Dehydrogenase-Reaktion gemessen wird. Für längerkettige Derivate ließe sich ein analoger Test mit Carnitin-Palmityltransferase entwerfen (5o), deren Kettenlängenspezifität allerdings noch nicht untersucht wurde.

E.D.Barber und W.E.M.Lands (98) nutzen die Acyl-CoA-Hydrolase-Nebenaktivität des Enzyms Pankreas-Lipase aus und bestimmen das freigesetzte CoA mit der DTNB-Methode. Die Maximalgeschwindigkeit der Hydrolyse nimmt in der Reihenfolge 14:o > 16:o > 18:o > 12:o > > 2o:o ab. Der Test wurde bisher nur für reine LCFA-CoA-Lösungen ausprobiert; die relative Unempfindlichkeit der DTNB-Methode überträgt sich natürlich auf den ganzen Test.

Der bisher am ausführlichsten ausgearbeitete Test in dieser Kategorie ist in (95) beschrieben. Er kombiniert die Thioesterase-

Nebenaktivität von Fettsäuresynthetase aus Rattenleber mit einem, dem kinetischen Test in 2.3. analogen, gekoppelten Test mit Carnitin-Acetyltransferase (statt Phosphotransacetylase), Citratsynthase und Malat-Dehydrogenase. Der Reaktionsablauf ist wie folgt:

(XVIIIa) $R\text{-}COSCoA + H_2O \xrightarrow{(Leber\text{-}FAS)} R\text{-}COOH + CoASH$

(XVIIIb) $CoASH + Acetyl\text{-}Carnitin \underset{}{\overset{(CAT)}{\rightleftharpoons}} Acetyl\text{-}SCoA + Carnitin$

(XVIIIc) $Acetyl\text{-}SCoA + Oxalacetat + H_2O \overset{(CS)}{\rightleftharpoons} CoASH + Citrat$

(XVIIId) $Malat + NAD^+ \overset{(MDH)}{\rightleftharpoons} Oxalacetat + NADH + H^+$

(XVIII) $R\text{-}COSCoA + 2\ H_2O + Acetyl\text{-}Carnitin + Malat + NAD^+ =$
$= R\text{-}COOH + CoASH + Carnitin + Citrat + NADH + H^+$

Nach (51) ist in Test b4 ein Ersatz der Phosphotransacetylase-Reaktion durch die Carnitin-Acetyltransferase-Reaktion nicht zu empfehlen, da Carnitin-Acetyltransferase bereits merklich mit 3'-Dephospho-CoA reagiert.

Bei der in (95) beschriebenen Ausführungsform handelt es sich eigentlich um eine Kombination aus Endwertmethode und kinetischem Test: Die Thioesterhydrolyse läuft in einem separaten Reaktionsgefäß bis zum Ende ab; dann muß mit verdünnter HCl abgestoppt, sodann neutralisiert und ein Aliquot der Inkubationsmischung in eine Küvette überführt werden, in der der kinetische Test nach den Reaktionsgleichungen (XVIIIb) bis (XVIIId) abläuft. Daraus ergeben sich zwei Nachteile: einmal kann nicht der gesamte Reaktionsablauf in einer Küvette erfolgen, wie es wünschenswert wäre, und zum anderen wird die an und für sich hohe Empfindlichkeit des kinetischen Tests durch die notwendige Aliquotentnahme um den Faktor (Aliquotvolumen/Volumen der Inkubationsmischung) herabgemindert, so daß in der Originalarbeit immerhin 2 bis 5 nMol LCFA-CoA eingesetzt werden mußten.

Aus einer in (95) angegebenen Tabelle, in der die mit verschiedenen Methoden erhaltenen Werte für verschiedene LCFA-CoA-Derivate miteinander verglichen werden, geht hervor, daß - verglichen mit der aus E_{260} errechneten Konzentration (gleich 1oo % gesetzt) - mit enzymatischer Hydrolyse bei Oleyl-CoA 82,1 %, bei PCoA 56,7 % und bei anderen Verbindungen teilweise noch weniger gemessen wird, und daß die Werte für alkalische Hydrolyse mit anschließendem Test wesentlich näher an 1oo % liegen.

Mit einem Vorversuch mit selbst angereicherter Rattenleber-Fettsäuresynthetase beabsichtigten wir, die Wirksamkeit dieses Enzyms als LCFA-CoA-Thioesterase zu untersuchen. Da nach der Nachreinigung jedoch nur noch ca.85 mU Fettsäuresynthetase verfügbar waren und ein einziger Testansatz nach (95) 4o mU erfordert, wurde auf genaue Ausführung des Tests verzichtet und lediglich ein Aliquot Fettsäuresynthetase in einen kinetischen Test-Ansatz (Phosphotransacetylase/Citratsynthase/Malat-Dehydrogenase-Methode) mit 56,8 nMol PCoA einpipettiert (das PCoA enthielt 8,5 % SH-Gruppen, gemessen mit der DTNB-Methode). Es hätte also wenigstens eine Beschleunigung der Geschwindigkeit der Extinktionszunahme um den Faktor 1oo/8,5 = 11,8 beobachtet werden müssen, die wegfallende Hemmung der Testenzyme durch PCoA noch nicht eingerechnet; es wurde jedoch auch nach langer Beobachtungsdauer nur ein wesentlich langsamerer Anstieg festgestellt. Immerhin war aber die Abweichung vom linearen Verlauf deutlich zu sehen.

Da nicht mehr genügend Enzym vorhanden war und eine nochmalige Anreicherung wegen des damit verbundenen großen Zeitaufwands und der geringen Stabilität des Enzyms als nicht zweckmäßig erschien, wurde von einer - prinzipiell durchaus erfolgversprechenden - Weiterentwicklung dieses Tests abgesehen. Die im Zusammenhang mit diesem Kapitel durchgeführten Anreicherungen von Fettsäuresynthetase aus Rattenleber und aus Bäckerhefe, die Synthesen von Acetyl- und Malonyl-CoA sowie die entsprechenden Testverfahren sind in 6.3.2. beschrieben.

Bei allen beschriebenen und noch denkbaren Verfahren, die eine enzymatische Spaltung der LCFA-CoA-Thioesterbindung mit enzymatischer Bestimmung des freiwerdenden CoA verbinden, treten folgende prinzipielle Schwierigkeiten auf:
a) Bei kinetischer Gestaltung des Tests muß die Kettenlängenspezifität der verschiedenen Enzyme mit Thioesteraseaktivität berücksichtigt werden: Abhängig vom jeweiligen Acylrest werden verschiedene Geschwindigkeiten beobachtet.
b) Bei einer Endwertmethode ist vollständige Hydrolyse notwendig. Wird Vollständigkeit der Hydrolyse nicht erreicht, so wird ein zu kleiner LCFA-CoA-Meßwert nicht nur deswegen erhalten, weil nicht alles LCFA-CoA hydrolysiert ist, sondern auch, weil die im CoA-Test verwendeten Enzyme durch nicht umgesetztes LCFA-CoA

gehemmt werden können (z.B.Citratsynthase und Malat-Dehydrogenase in Test b4 aus Tab.5).
Die Nichtspezifität der alkalischen Hydrolyse (s.3.3.1.) - d.h. die Unabhängigkeit von Geschwindigkeit und Reaktionsendpunkt von der Natur des Acylrests - kann hier also ein Vorteil sein.

3.3.3. Die Differenzspektrenmethode

a) Bezug zur Phosphotransacetylase-Endwertmethode

Die sog."Differenzspektrenmethode" zur Bestimmung von Acyl-CoA-Verbindungen beruht auf dem Verschwinden der 232 nm-Bande während der Hydrolyse der Thiolesterbindung (s.3.1.2.). Sie ist im Prinzip eine Umkehrung der Phosphotransacetylase-Endwertmethode (Test a5, s.2.2.2.), bei der das Entstehen der Thiolesterbindung - in diesem Fall derjenigen des Acetyl-CoA - über die Zunahme der 232 nm-Absorption verfolgt wird.

Die Differenz zwischen den molaren Extinktionskoeffizienten von Acetyl-CoA (bzw.anderen Acyl-CoA-Verbindungen) und CoA beträgt $\Delta\epsilon_{232} = 4{,}4 \times 10^6$ cm^2/Mol. Da im wesentlichen nur CoA selbst von Phosphotransacetylase umgesetzt wird, wird dieser Wert in der Endwertmethode für die Berechnung der Reinheit des CoA-Präparats herangezogen (s.2.2.2.). Da andererseits die Extinktion bei 260 nm der Gesamtkonzentration an CoA, CoA-Derivaten und adeninenthaltenden CoA-Bruchstücken entspricht und somit die aus E_{260} berechnete CoA-Menge annähernd mit der Einwaage des CoA-Präparats übereinstimmt, ist der Quotient $\Delta E_{232}/E_{260}$ ein Maß für dessen Reinheit. Der theoretische Wert $\Delta\epsilon_{232}/\epsilon_{260} = 0{,}27$ entspricht dabei 100 % reinem CoA.

Wendet man die Differenzspektrenmethode auf den Phosphotransacetylasetest an, indem man einfach das UV-Spektrum vor (1) und nach Zugabe (2) der Phosphotransacetylase zum Testansatz aufnimmt und die beiden Lösungen auch gegeneinander mißt (3), so sollten die folgenden Bedingungen gelten:

(XIXa) $E_{260}(2) - E_{260}(1) = \Delta E_{260} = E_{260}(3) = 0{,}00$
(XIXb) $E_{232}(2) - E_{232}(1) = \Delta E_{232} = E_{232}(3)$

Außerdem sollten die theoretischen Werte für die Quotienten erfüllt sein:

(XXa) $E_{232}(1)/E_{260}(1) = 0{,}30$
(XXb) $0{,}30 \leq E_{232}(2)/E_{260}(2) \leq 0{,}57$
(XXc) $0{,}00 \leq \Delta E_{232}/E_{260}(1;2) = E_{232}(3)/E_{260}(1;2) \leq 0{,}27$
mit $E_{260}(1;2) = 1/2\ (E_{260}(1) + E_{260}(2))$
(Die unteren Grenzwerte gelten für 0 %, die oberen für 100 % CoA-Gehalt.)

Es wurden jedoch Werte erhalten, die diese Bedingungen nicht genau erfüllen (s.Tab.14 und 15). Dies liegt u.a. an der Eigenabsorption der Phosphotransacetylase, die bei der Endwertmethode selbst eliminiert wird, indem nach Beendigung der Reaktion nochmals die gleiche Menge Phosphotransacetylase zugegeben und die beobachtete Extinktionsänderung ΔE_2 (bei 232 nm) von der zuerst gemessenen (ΔE_1) subtrahiert wird. Falls die Reaktion noch nicht vollständig abgelaufen ist, addieren sich dabei allerdings die Fehler; ΔE_2 wird um denselben Betrag größer, um den ΔE_1 kleiner wird. Bei der Differenzspektrenmethode können hilfsweise die erhaltenen UV-Spektren auf $E_{300} = 0{,}00$ normiert werden; dieses Verfahren liefert ausreichend gute Ergebnisse (s.Abb.30).

In einer weiteren Versuchsreihe wurden noch die in Tab.13 beschriebenen UV-Spektren aufgenommen:

Tab.13: UV-Spektren

Nr.	Meßküvette	Vergleichsküvette	erwartet
(1)	CoA	-	CoA-Spektrum; (XXa)
(2)	CoA + PTA	PTA	CoA-Spektrum; (XXa)
(3)	CoA + Acetylphosphat + PTA	Acetylphosphat + PTA	Acetyl-CoA-Spektrum; (XXb)
(4)	CoA + Acetylphosphat + PTA	PTA	Acetyl-CoA-Spektrum; (XXb)
(5)	CoA + Acetylphosphat + PTA	CoA + PTA	Differenzspektrum; (XIXa)
(6)	Acetylphosphat	-	-

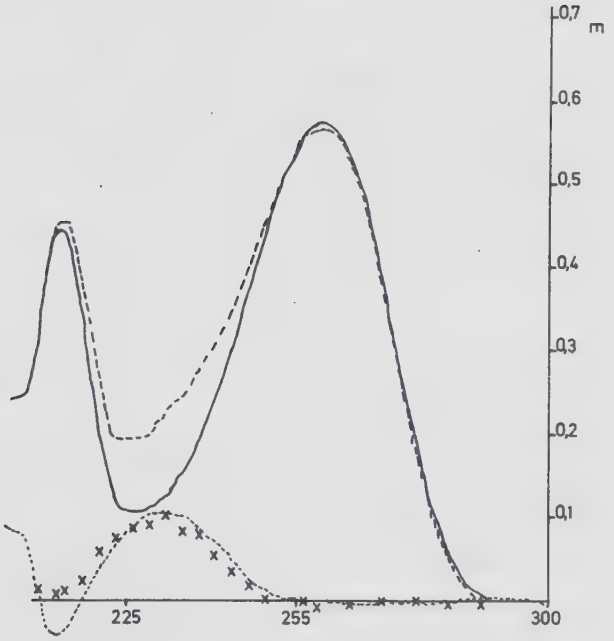


Abb.3o: Untersuchung der Differenzspektrenmethode an Hand der Phosphotransacetylase-Endwertmethode (Test a5) (korrigierte Werte)
——— vor PTA-Zugabe (CoA + Acetylphosphat/ H_2O)
---- nach PTA-Zugabe (CoA + Acetylphosphat + PTA/ H_2O)
----- gemessenes Differenzspektrum
x berechnetes Differenzspektrum

Die UV-spektroskopischen Daten sind in Tab.14 wiedergegeben; auf der rechten Seite sind die durch Subtraktion von E_{300} korrigierten Extinktionen angeführt. Die Extinktionen von Spektrum (3) mußten außerdem noch um die Eigenabsorption des Acetylphosphats korrigiert werden. Die korrigierten Extinktionswerte erfüllen die oben angegebenen Gleichungen wesentlich besser.

In Tab.15 wird schließlich noch die weitgehende Übereinstimmung zwischen korrigiertem Differenzspektrum und allen möglichen

Tab.14: Spektroskopische Daten zu den UV-Spektren aus Tab.13
Definitionen: $E'_{260} = E_{260}-E_{300}$; $E'_{232} = E_{232}-E_{300}$

	nichtkorrigierte Werte				korrigierte Werte		
Nr.	E_{260}	E_{232}	E_{300}	E_{232}/E_{260}	E'_{260}	E'_{232}	E'_{232}/E'_{260}
(1)	0,73	0,24	0,05	0,32	0,68	0,19	0,28
(2)	0,69	0,20	0,02	0,29	0,67	0,18	0,27
(3)	0,74	0,28	0,05	0,38	0,70	0,32	0,46
(4)	0,77	0,41	0,08	0,53	0,69	0,33	0,48
(5)	0,12	0,24	0,07	-	0,05	0,17	-
(6)	0,03	0,11	0,02	-	0,01	0,09	-

Tab.15: Differenzbildung aus den in Tab.14 angegebenen Extinktionswerten (Sollwerte: $\Delta E_{260}=0,00$; $\Delta E'_{232}=0,17 \triangleq$ Spektrum (5))

Differenz bzw. Mittelwert aus	$\overline{E_{260}}$	ΔE_{260}	ΔE_{232}	$\Delta E_{232}/\overline{E_{260}}$	$\overline{E'_{260}}$	$\Delta E'_{260}$	$\Delta E'_{232}$	$\Delta E'_{232}/\overline{E'_{260}}$
(3;1)	0,74	0,01	0,04	0,05	0,69	0,02	0,13	0,19
(3;2)	0,72	0,05	0,08	0,11	0,69	0,03	0,14	0,20
(4;1)	0,75	0,04	0,17	0,23	0,69	0,01	0,14	0,20
(4;2)	0,73	0,08	0,21	0,29	0,68	0,02	0,15	0,22

Differenzen zwischen den Spektren (1) und (2) einerseits und (3) und (4) andererseits demonstriert. Aus dem Mittelwert für die Quotienten $\Delta E'_{232}/E'_{260}$ = 0,20 (Sollwert für 100 % CoA-Gehalt 0,27) ergibt sich ein CoA-Gehalt von 75 %. Die aus den unkorrigierten Spektren entnommenen Quotienten $\Delta E_{232}/E_{260}$ streuen dagegen so stark, daß keine abgesicherte Aussage über den CoA-Gehalt möglich ist.

b) Simulierung der Differenzspektrenmethode mit N,S-Diacetylcysteamin und ATP

Das typische UV-Spektrum einer Acyl-CoA-Verbindung, das sich aus einer Adenin- und einer Thioesterbande zusammensetzt, läßt sich auch durch Addition unabhängiger Spektren von zwei Verbin-

dungen erzeugen, von denen eine nur die Adenin- und die andere nur die Thioesterabsorption aufweist. Als Verbindung mit Thioesterabsorption verwendeten wir N,S-Diacetylcysteamin, als Verbindung mit Adeninabsorption ATP. Mit einer 1:1-Mischung dieser beiden Verbindungen simulierten wir die Bestimmung von Acyl-CoAs mit Hilfe der Differenzspektrenmethode. Verseifung, Neutralisation und Auffüllen mit Puffer geschahen ähnlich wie in 3.3.1. Auch hier konnten wir durch Korrektur der Extinktionswerte analog 3.3.3.a) (Normierung auf E_{300} = o,oo) eine weitgehende Übereinstimmung der Ergebnisse mit den theoretisch erwarteten Werten erhalten (s.Tab.16).

Tab.16: UV-Spektren und Differenzspektren von N,S-Diacetylcysteamin und N,S-Diacetylcysteamin:ATP = 1:1 -Mischungen

Nr.	E_{232}	E_{260}	E_{300}	$\frac{E_{232}}{E_{260}}$	E'_{232}	E'_{260}	$\frac{E'_{232}}{E'_{260}}$
(1) N,S-Diacetylcysteamin	o,29	o,1o	o,o9	-	o,1o	o,o1	-
(2) N,S-Diacetylcysteamin verseift	o,o2	o,o6	o,o6	-	-o,o4	o,oo	-
(3) Differenzspektrum (1;2)	o,24	o,1o	o,o9	-	o,15	o,o1	-
(1) - (2)	o,27	o,o4	o,o3	-	o,14	o,o1	-
(4) N,S-Diacetylcysteamin:ATP= = 1:1	o,57	1,o4	o,13	o,55	o,44	o,91	o,48
(5) N,S-Diacetylcysteamin:ATP= = 1:1, verseift	o,37	1,oo	o,11	o,37	o,26	o,89	o,29
(6) Differenzspektrum (4;5)	o,23	o,1o	o,o6	-	o,17	o,o4	-
(4) - (5)	o,2o	o,o4	o,o2	-	o,18	o,o2	-

c) Anwendung der Differenzspektrenmethode auf die Bestimmung von LCFA-CoAs

Im Prinzip kann für die Bestimmung von LCFA-CoAs die gleiche Vorschrift für Verseifung und Aufnahme des Differenzspektrums wie in 3.3.3.a) und b) angewendet werden. Jedoch stört hier die durch die bei der Verseifung entstehende Fettsäure hervorgerufene Trübung. Versuche, diese Trübung durch Zusatz von Äthanol, Aceton oder Triton X-1oo zu beseitigen und das Differenzspektrum und die Einzelspektren dadurch zu verbessern, schlugen fehl. Daher

wurde wieder auf die Vorschrift (34) zurückgegriffen, bei der in den LCFA-CoA-Verseifungsansatz nach der Neutralisation 1o Vol.-% Methanol gegeben werden. Meist bleibt jedoch weder E_{26o} noch E'_{26o} während der Verseifung genau konstant, so daß das sich aus dem Differenzspektrum ergebende E_{232} besser auf E_{26o} = o,oo normiert wird (statt auf E_{3oo}). Zugabe von Methanol auch zum nicht verseiften Ansatz erbrachte entgegen (76) in dieser Hinsicht keine Verbesserungen.

Bei Anwendung der Vorschrift (34) auf eine selbst hergestellte PCoA-Lösung erhielten wir folgende Konzentrationen:

aus E'_{26o} 3,75 bzw. 3,58 mM (aus zwei an verschiedenen Tagen aufgenommenen Spektren),

aus E'_{26o} nach Verseifung 3,29 mM,

aus ΔE_{232} 3,64 mM.

Alle diese Werte stimmen gut miteinander überein.

d) Verseifungskurven

Schließlich erschien es noch interessant, den zeitlichen Verlauf der LCFA-CoA-Verseifung - wie schon in 3.3.1. mit dem kinetischen Test - auch UV-spektroskopisch zu untersuchen.

Es wurden folgende Verseifungsansätze bei 37°C inkubiert:

a) 476 µM CoA + 9,5 mM DTT + 1,9 N KOH (Pseudoverseifung)
b) 767 µM PCoA + 9,5 mM DTT + 1,9 N KOH
c) 82o µM Stearyl-CoA + 8 mM DTT + 1,6 N KOH

Nach bestimmten Zeiten wurde, ganz analog zu 3.3.1., mit HCl abgestoppt und mit Puffer aufgefüllt.

Die UV-Spektren für alle Ansätze wurden ausgemessen und E_{26o} und E_{232} wie üblich normiert. Die Korrektur um E_{3oo} erwies sich auch hier von Vorteil; in b) z.B.blieb E_{232} etwa gleich (mit Schwankungen), während E_{26o} anstieg; nach Korrektur - der Anstieg war auf die Veränderung des Untergrundes zurückzuführen - blieb E'_{26o} etwa konstant (s.Abb.31), während E'_{232} erwartungsgemäß abfiel.

In den Abbildungen 31 und 32 sind die Veränderungen der um E_{3oo} korrigierten Extinktionen E'_{26o} und E'_{232} in Abhängigkeit von der Dauer der Verseifung bei 37°C graphisch dargestellt, und zwar

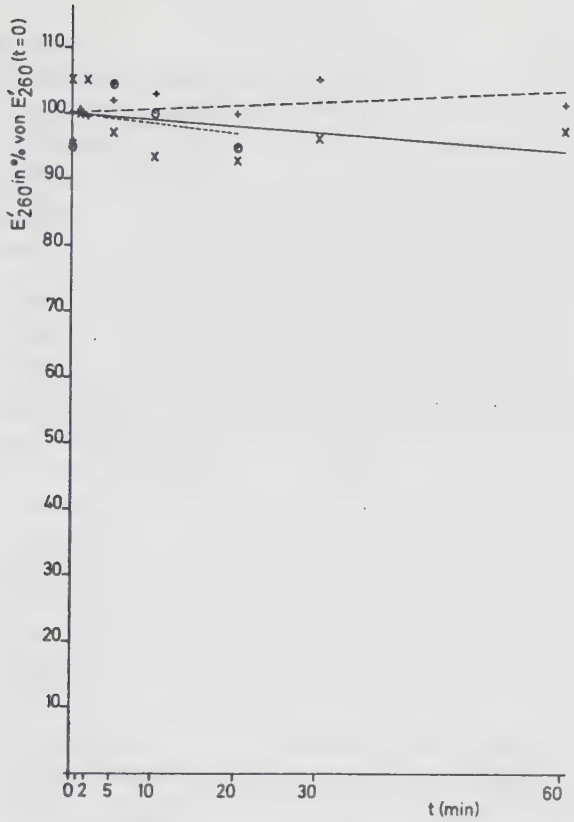


Abb.31: E'_{260} von CoA, PCoA und Stearyl-CoA in Abhängigkeit von der Verseifungsdauer
+----- a) 476 µM CoA, 1,9 N KOH, 9,5 mM DTT
⊙····· b) 767 µM PCoA, 1,9 N KOH, 9,5 mM DTT
x——— c) 82o µM Stearyl-CoA, 1,6 N KOH, 8 mM DTT

in % vom Ausgangswert (t = o). E'_{260} ändert sich nur geringfügig; bei allen drei Ansätzen werden - in Übereinstimmung mit der Theorie - vergleichbare Werte erhalten. E'_{232} bleibt bei CoA ebenfalls annähernd konstant, fällt jedoch bei PCoA und Stearyl-CoA erwartungsgemäß rasch ab. In den ersten 5 min erfolgt ein schnelles Absinken der E'_{232}-Werte, die sich dann asymptotisch dem Grenzwert 52,6 % (= o,3o/o,57) nähern.

Der Quotient E'_{232}/E'_{260} sollte theoretisch für CoA konstant o,3o betragen und für die beiden LCFA-CoA-Verbindungen von o,57 auf diesen Wert absinken. Trägt man E'_{232}/E'_{260} gegen t auf (hier

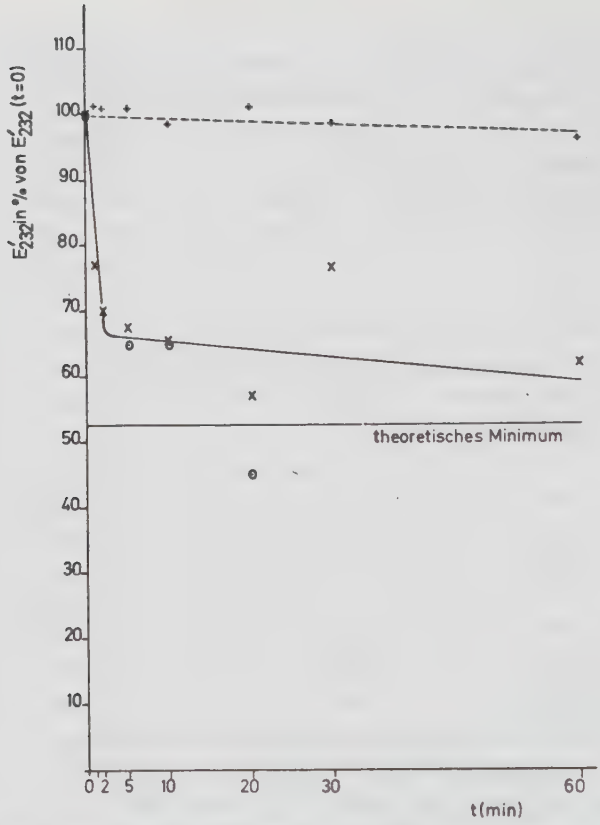


Abb.32: E'_{232} von CoA, PCoA und Stearyl-CoA in Abhängigkeit von der Verseifungsdauer
+----- a) 476 µM CoA, 1,9 N KOH, 9,5 mM DTT
o b) 767 µM PCoA, 1,9 N KOH, 9,5 mM DTT
x—— c) 820 µM Stearyl-CoA, 1,6 N KOH, 8 mM DTT

nicht dargestellt), so ist der Wert für CoA tatsächlich konstant, liegt aber mit durchschnittlich o,4o ± o,o1 (8) zu hoch; die Anfangswerte (t = o) für PCoA und Stearyl-CoA liegen mit o,66 bzw. o,64 ebenfalls zu hoch und scheinen sich nach der Verseifung auf dem höheren Niveau (o,4) für CoA einzupendeln. Die zu hoch liegenden Werte könnten vielleicht damit erklärt werden, daß kein Methanol (nach (76,34)) in den Verseifungsansatz gegeben wurde.

Schließlich kann noch der prozentuale Anteil des verseiften Acyl-CoAs für jedes t berechnet werden. Es sei $\Delta E'_{232} = E'_{232}(t=o) - E'_{232}(t)$

das ist also die (korrigierte) Extinktion bei 232 nm, die man bei Aufnahme eines Differenzspektrums zwischen unverseiftem LCFA-CoA und der gleichen Menge von t (min) lang verseiftem LCFA-CoA erhalten hätte. (Durch den systematischen Fehler des Quotienten E'_{232}/E'_{260} ist dieser Differenzwert allerdings mit einem Fehler behaftet, der die Berechnung relativ ungenau macht, besonders bei kleinen Differenzen - daher die herausfallenden Punkte in Abb.33.) Dann ist die Menge verseiften Thiolesters gleich $\frac{V}{v}\frac{\Delta E'_{232}}{4,4}$ (µMol/ml); die Gesamtmenge an verseiftem und unverseiftem Acyl-CoA (bzw. die zu Beginn der Verseifung vorhandene Menge Acyl-CoA) ist gleich $\frac{V}{v}\frac{E'_{260}}{16,4}$ (µMol/ml). Daraus errechnet sich der prozentuale Anteil des verseiften Produkts zu $100.\frac{16,4}{4,4}.\frac{\Delta E'_{232}}{E'_{260}(t)}$. Die so erhaltenen Werte sind in Abb.33 graphisch dargestellt.

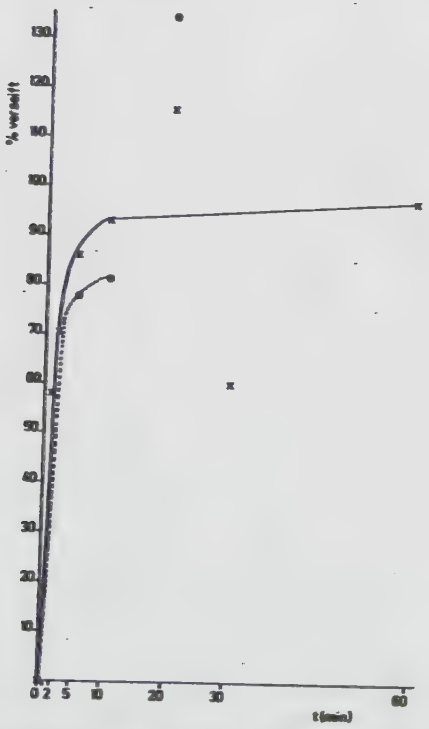


Abb.33: Inkubation von PCoA und Stearyl-CoA in KOH - Berechnung des verseiften Anteils aus dem UV-Spektrum ($x = 100 \cdot \frac{16,4}{4,4} \cdot \frac{E'_{232}(t=0)-E'_{232}(t)}{E'_{260}(t)}$) und Auftragung gegen die Verseifungsdauer
o----- b) 767 µM PCoA, 1,9 N KOH, 9,5 mM DTT
x——— c) 820 µM Stearyl-CoA, 1,6 N KOH, 8 mM DTT

Bei den in 3.3.3.d) angeführten Werten handelt es sich eigentlich um die durch Subtraktion normaler UV-Spektren erhaltenen Extinktionsdifferenzen. Auf die Aufnahme von tatsächlichen Differenzspektren in verschiedenen Stadien der Verseifung verzichteten wir, weil sich damit kaum neue Aspekte ergeben hätten.

In Abb.34 sind nochmals die in b) nach verschiedenen Zeiten (o, 5, 1o, 2o min) erhaltenen Stadien der Verseifung dargestellt; das aus unverseiftem PCoA und dem 2o min lang inkubierten Ansatz berechnete Differenzspektrum ist mit eingezeichnet.

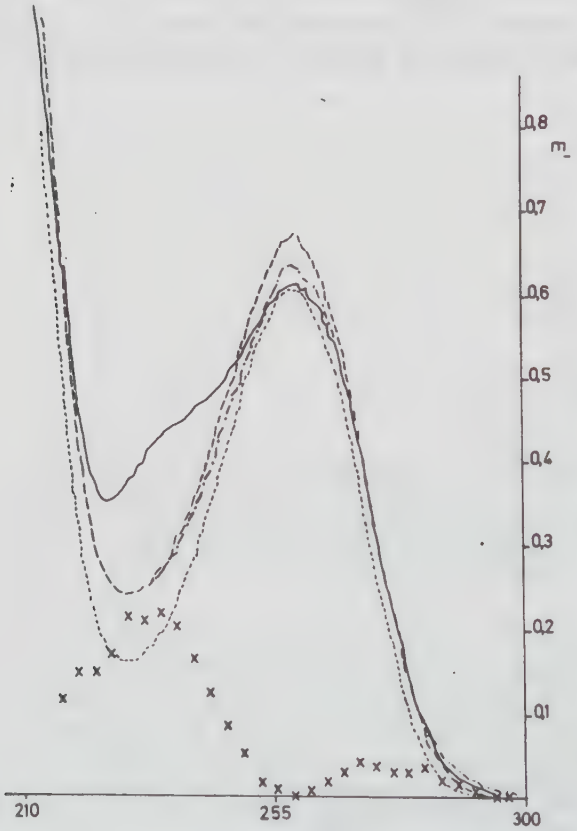


Abb.34: Veränderung des UV-Spektrums von PCoA während der Verseifung (b)767 µM PCoA, 1,9 N KOH, 8 mM DTT)
——— o min
– – – – 5 min
—·—·— 1o min
····· 2o min
x Differenz (o;2o)

3.3.4. Hydroxamsäure-Methode

Neben der enzymatischen (s.3.3.2.) und alkalischen (3.3.1. und 3.3.3.) Hydrolyse von LCFA-CoA-Verbindungen gibt es noch eine weitere Möglichkeit, die Thioesterbindung zu spalten: die schon in 2.4.1. behandelte - dort zur Bestimmung von Acetylphosphat benutzte - Hydroxamsäuremethode. Acyl-CoA-Verbindungen reagieren mit Hydroxylamin zu der entsprechenden Acylhydroxamsäure, wobei CoA freigesetzt wird:

(XXI) $R\text{-}COSCoA + H_2NOH = R\text{-}CONHOH + CoASH$

Eine Kombination dieser Reaktion mit anschließendem CoA-Test zum Zwecke der Bestimmung der Acyl-CoA-Verbindung wurde bisher nicht beschrieben, wohl aber die Bestimmung der Acylhydroxamsäure mit Hilfe der Farbreaktion mit Fe^{3+}-Ionen (s.2.4.1. und 2.4.2.). Ganz analog zu der in 2.4.2. beschriebenen Acetylphosphat-Bestimmung testeten wir verschiedene synthetische Acyl-CoA-Präparate (Propionyl-, Butyryl-, Lauryl- und Arachidyl-CoA). Die Übereinstimmung mit den UV-spektroskopisch bestimmten Gehaltswerten war zufriedenstellend. Wegen der relativ niedrigen Empfindlichkeit (Nachweisgrenze o,25 µMol) und der Unspezifität des Tests verwendeten wir ihn jedoch nicht als Routinemethode.

Bei Änderung der Versuchsbedingungen (insbesondere Verwendung einer äthanolischen statt einer wäßrigen $FeCl_3$-Lösung) lassen sich auch die weniger reaktiven O-Acylester bestimmen (1oo). Abb.35 zeigt die von uns erhaltene Eichgerade für den Triglycerid-Standard Glycerintripalmitat.

Neben der Bestimmung in Lösungen ist auch die Detektion von Acyl-CoAs auf Dünnschichtplatten möglich; zunächst besprüht man mit einer 4 N neutralen $NH_2OH.HCl$-Lösung, dann mit einem "$FeCl_3$-Reagens" (5 % $FeCl_3$: 12 % TCA : 3 N HCl = 1:1:1). Bei der auch für den in 2.4.2. beschriebenen Test verwendeten Eichsubstanz Succinhydroxamsäure stellten wir eine Nachweisgrenze von $<$ o,6 nMol fest. Von I.S.Rosenfeld et al. (1o1) wurde sogar eine Auftrennung der Acyl-CoAs in Abhängigkeit von der Art des Fettsäurerestes beschrieben, die eine $AgNO_3$-Kieselgel-Dünnschichtchromatographie der Acetylacylhydroxamat-Derivate zur Grundlage hat.

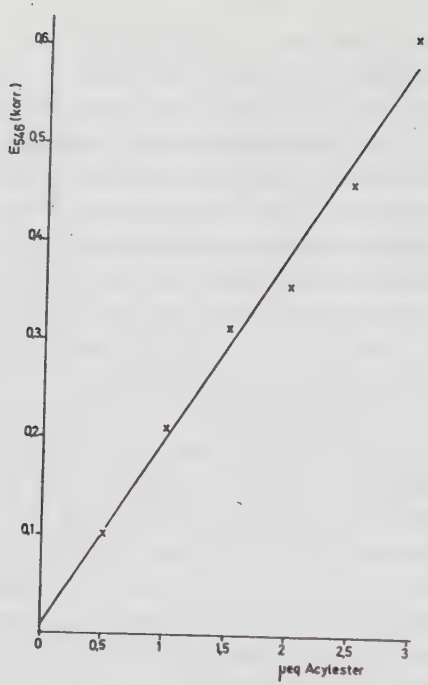


Abb.35: Eichgerade für die modifizierte Hydroxamsäure-Methode (verändert nach (1oo)) mit Tripalmitin als Standard

3.3.5. Alkalische Hydrolyse der Thioesterbindung mit anschließender nichtenzymatischer Bestimmung des freigesetzten CoA

a) Verzögerte Nitroprussid-Reaktion

Die in 2.5.2.a) erwähnte Nitroprussid-Farbreaktion für Thiole läßt sich nach (1o2) auch für Thiolester anwenden, wenn man diese zunächst mit konzentriertem NH_3 oder mit methanolischer NaOH verseift. Bei dem von F.Lynen beschriebenen Test stören u.a. freie Mercaptane (wie Glutathion und CoA), Ketonkörper (Acetacetat, Aceton, Kreatinin) sowie SH-Reagenzien und Oxidationsmittel (Iod, Iodacetamid, Arsenat), so daß der Test nicht auf Rohextrakte anwendbar ist.

Geht man bei der Detektion auf Papier- oder Dünnschichtchromatogrammen umgekehrt vor (zuerst Besprühen mit Nitroprussid-Reagens, dann mit Lauge), so entwickelt sich ein roter Fleck bei Thiolen sofort nach dem Nitroprussid-Spray, bei Thiolestern erst

nach einiger Zeit, wenn sich genügend Thiol gebildet hat; daher spricht man von einer "verzögerten Nitroprussid-Reaktion". Für PCoA ermittelten wir eine Nachweisgrenze von ‹ o,39 µg.

Wie in 2.5.2.a) bereits erwähnt, verblaßt die rote Farbe des Komplexes (λ_{max} = 54o nm) ziemlich schnell; sie kann mit CN^- stabilisiert (74,1o3) und durch Besprühen mit Diäthyläther verstärkt werden (7o).

Zur Identifizierung von Acyl-CoAs als Acylmercaptane, also Stoffe, die sowohl eine reaktive Acylgruppe als auch eine derivatisierte SH-Gruppe enthalten, kombinierte E.R.Stadtman die Nitroprussid-Reaktion mit der Hydroxamsäure-Methode (1o4). Ein Fleck auf einem Papierchromatogramm wird mit H_2NOH und dann mit $FeCl_3$-Spray besprüht (rotviolette Färbung aufgrund des Acylrestes; s.3.3.4.); ein Parallelfleck wird ebenfalls mit H_2NOH und nach Entfernung des überschüssigen H_2NOH mit Methanol (H_2NOH stört im Nitroprussidtest) mit Nitroprussid-Reagens besprüht (rote Färbung aufgrund des Mercaptanrestes).

b) DTNB-Methode

Auch die in 2.5.2.b) beschriebene DTNB-Methode zur kolorimetrischen Bestimmung von Thiolen läßt sich auf LCFA-CoAs und andere Thiolester anwenden, wenn diese zuerst verseift werden. Es wurde mit einem dem Ansatz in 3.3.1. analogen Testansatz gearbeitet; nach bestimmten Zeiten wurde die Verseifungsreaktion abgestoppt und ein Aliquot für den Test nach (75) verwendet. Auf diese Weise untersuchten wir den zeitlichen Verlauf der Verseifung (bzw. "Pseudoverseifung") von:

1 mM CoA in 2 N KOH bei o, 25 und 37°C (Abb.36)
1,818 mM DTT in 3,64 N KOH bei o, 25 und 37°C (Abb.37)
2,683 mM PCoA in 3,33 N KOH bei 37°C (Abb.38)

Die erhaltenen Verseifungskurven ähneln den in 3.3.1. und 3.3.3. mit anderen Methoden erhaltenen. Bei CoASH sind die Veränderungen der Konzentration an freiem -SH innerhalb der Verseifungsdauer von 6o min anscheinend nicht signifikant. Der SH-Gehalt in einer alkalischen DTT-Lösung scheint dagegen zumindest bei

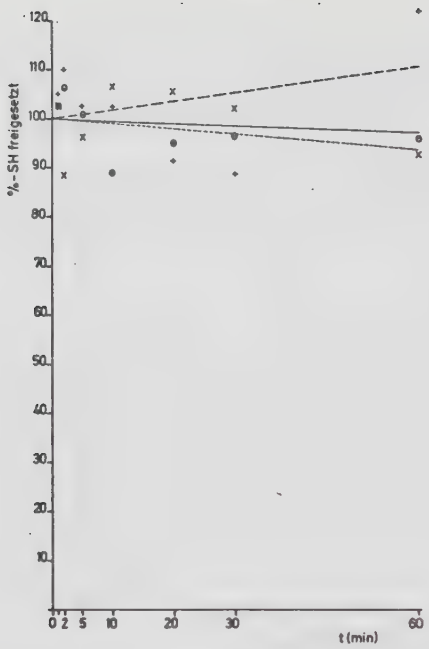


Abb.36: "Pseudoverseifung" von 1 mM CoA in 2 N KOH (DTNB-Test)
x—— 0° +---- 25° o····· 37°

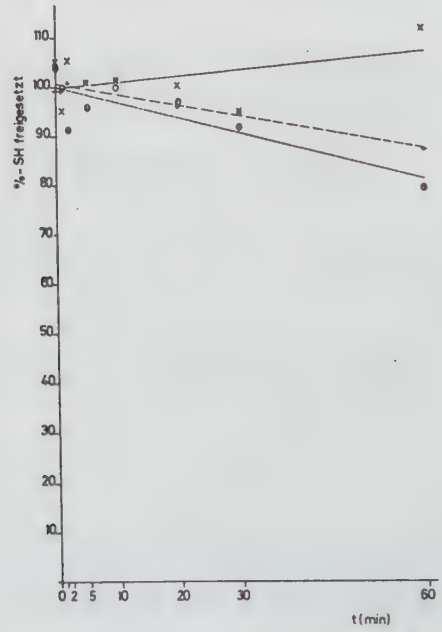


Abb.37: "Pseudoverseifung" von 1,818 mM DTT in 3,64 N KOH (DTNB-Test)
x—— 0° +---- 25° o····· 37°

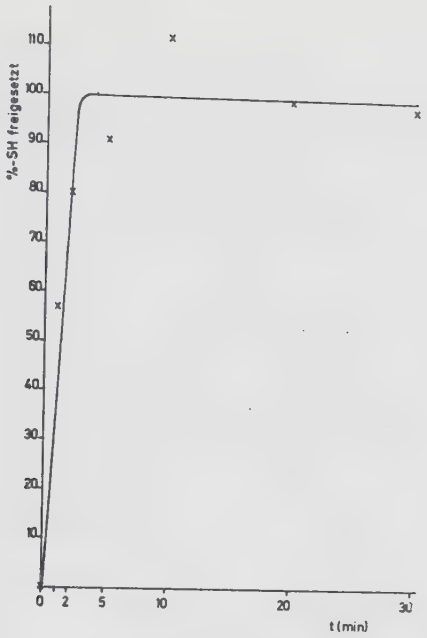


Abb.38: Verseifung von 2,683 mM PCoA in 3,33 N KOH bei 37°C (DTNB-Test)

höheren Temperaturen (25 und 37°C) langsam abzunehmen - wohl eine Folge der energetisch begünstigten Bildung eines cyclischen Disulfids. Die Freisetzung von -SH aus PCoA erfolgt ganz ähnlich wie bei den in 3.3.1. und 3.3.3. aufgenommenen Verseifungskurven: Auf einen anfänglichen raschen Anstieg folgt das Erreichen eines Plateaus.

3.3.6. Alkalische Hydrolyse der Thioesterbindung mit anschließender Bestimmung der freigesetzten Fettsäure

Statt das CoA zu bestimmen oder die reaktive Acylgruppe an sich (bei der Hydroxamsäure-Methode), ist es auch möglich, mit einer dem in 3.3.1. angegebenen Ansatz analogen Verseifungsmischung nach Abstoppen der Reaktion nach einer bestimmten Zeit durch Ansäuern und anschließendes Ausschütteln mit einem mit Wasser nicht mischbaren organischen Lösungsmittel (z.B.Petroläther) die freigesetzte Fettsäure zu isolieren und sie - sofern sie radioaktiv markiert war - quantitativ zu bestimmen.

Wir entwickelten einen radiochemischen Test für 1-^{14}C-PCoA, bei dem wir im Volumen 2,1 ml in ca.12 % NH_3 2o min bei 37°C verseifen ließen - nach den gemessenen Verseifungskurven ist die Verseifung unter diesen Bedingungen vollständig - dann am Rotationsverdampfer zur Trockene brachten, in 1 N HCl aufnahmen und mit Petroläther ausschüttelten. Sodann wurde die Radioaktivität in Oberphase (UP) und Unterphase (LP) bestimmt.

Bei verschiedenen eingesetzten Mengen 1-^{14}C-PCoA wurden im Mittel 85,8 ± 7,1 % der Radioaktivität wiedergefunden (Ipm ohne Quenchkorrektur). Der Anteil der in der UP enthaltenen Radioaktivität wuchs mit steigender Radioaktivitätsmenge von 9o,3 auf 95,3 % an (s.Tab.17). Die in der UP wiedergefundene 1-^{14}C-Palmitinsäure-Radioaktivität ist proportional zur eingesetzten 1-^{14}C-PCoA-Menge; die Wiederfindung betrug im Mittel 8o,1 ± 6,o %.

Tab.17: Daten zum radiochemischen Test für 1-^{14}C-PCoA
Es bedeuten: I ≙ Ipm eingesetzt
II ≙ Ipm in der UP
III ≙ Ipm in der FLP

I	II	III	II+III	$\frac{(II+III)}{I}$.1oo	$\frac{II}{I}$.1oo	$\frac{I}{(II+III)}$.1oo
894o	7281	78o	8o61	9o,2	81,4	9o,3
2235o	16223	99o	17213	77,o	72,6	94,2
447oo	38952	2421	41373	92,6	87,1	94,1
67o5o	53245	261o	55855	83,3	79,4	95,3

Abb.39 zeigt den gemessenen zeitlichen Verlauf der Freisetzung von 1-^{14}C-Palmitinsäure bei Hydrolyse von 1-^{14}C-PCoA in o,95 N KOH bei 3o°C. Der Verlauf entspricht vollkommen den mit anderen Methoden aufgenommenen Verseifungskurven (s.3.3.1., 3.3.3., 3.3.5.b)).

Die Freisetzung von radioaktiven Fettsäuren bei der Verseifung von markierten LCFA-CoAs läßt sich auch zu ihrer dünnschichtchromatographischen Identifizierung verwenden. In Tab.18 sind die in der Literatur angegebenen und die selbst beobachteten Rf-Werte von freien Fettsäuren (meist 1-^{14}C-Palmitinsäure) auf Dünnschichtplatten wiedergegeben.

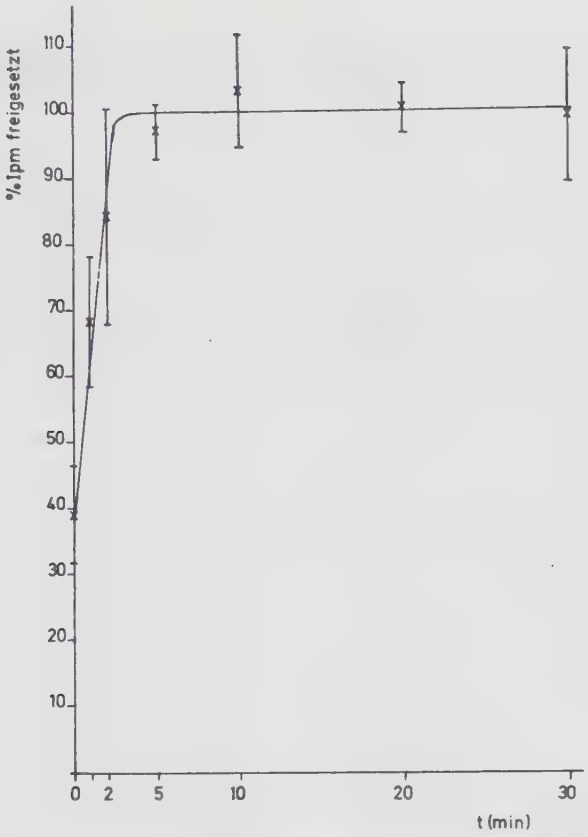


Abb.39: Freisetzung von 1-^{14}C-Palmitinsäure aus 1-^{14}C-PCoA bei Hydrolyse in o,95 N KOH bei 3o°C

Auch bei den Laufmitteln, in denen freie Fettsäuren bis zur Front laufen, tritt keine nennenswerte Fleckenverbreiterung ein. Dies wurde durch Scannen entlang der Front - also vertikal zur Chromatographierichtung - nachgewiesen; der Radius zweier nebeneinander aufgetragener und in Laufmittel E auf Cellulose gelaufener 1-^{14}C-Palmitinsäureflecken betrug auch nach einer Laufstrecke von 148 mm nur 6 mm. Dieses Verhalten ist in der zweidimensionalen (HP)TLC zur Lokalisierung von radioaktiv markierten Fettsäuren von Bedeutung.

Tab.18: Dünnschichtchromatographische Daten von Palmitinsäure (Zusammensetzung der Laufmittel s.6.1.4.)

a) Literaturwerte:

Literatur	Papiersorte bzw. Beschichtung	Laufmittel	Rf
(82)	Whatman 3 MM	G	o,7-Front
(86)	Kieselgel	I	Front*
(88)	Kieselgel	K	Front

*Dieser Wert konnte von uns nicht bestätigt werden (vgl. analog zusammengesetztes Laufmittel A).

b) eigene Werte:

Beschichtung	Laufmittel	Rf
Kieselgel	A	o,13-o,33
Kieselgel	B	o,96-Front
HPTLC	B	o,86
Kieselgel	D	o,94-o,96
Kieselgel	E	o,86-o,97
Cellulose	E	o,98-Front
HPTLC	E	Front
Kieselgel	L	o,65-o,88
Kieselgel	M	o,67-o,72
Kieselgel	N	o,46-o,48
Kieselgel	O	o,66-o,67

3.3.7. Vergleich der mit verschiedenen Methoden bestimmten Verseifungskurven

Es wurde bereits mehrfach auf die prinzipielle Ähnlichkeit zwischen den mit mehreren Methoden (kinetischer CoA-Test nach Verseifung, DTNB-Methode, Differenzspektren-Methode und radiochemische Methode) erhaltenen Verseifungskurven hingewiesen; dies wird durch die vergleichende Zusammenstellung der den Abbildungen 28, 29, 33, 36, 37, 38 und 39 zugrundeliegenden Daten dokumentiert (s.Tab.19).

		DTT	KOH	Temp.	0-	0+	1min	2min	5min	1omin	2omin	3omin	6omin
1) Pseudoverseifungskurven:													
a) kinetischer Test:	74,1µM CoA	-	1 N	3o°C	1o1,6 ±3,9	1oo,o ±3,3	1o1,1 ±6,2	1oo,6 ±o,4	97,1 ±3,6	94,o ±4,1	89,8 ±2,2	94,8 ±6,2	78,6 ±4,1
	37 µM CoA	1o mM	1 N	3o°C	1o6,7 ±13,9	1oo,o ±5,9	99,3 ±7,1	96,o ±2,6	94,1 ±2,6	93,9 ±1,2	9o,1 ±1,6	9o,8 ±6,9	78,5 ±11,8
c) DTNB-Methode:	-	1,82mM	3,64N	o°C	-	1o4,9	95,1	1o5,5	1oo,9	1o1,4	1oo,3	95,1	111,8
	-	1,82mM	3,64N	25°C	-	99,2	99,2	1oo,8	1oo,8	1o1,4	95,9	94,8	87,2
	-	1,82mM	3,64N	37°C	-	1o4,o	1oo,o	91,5	96,o	1oo,o	97,2	92,o	79,6
	1 mM CoA	-	2 N	o°C	-	-	1o2,6	88,3	96,2	1o6,4	1o5,5	1o2,o	92,5
	1 mM CoA	-	2 N	25°C	-	-	1o5,o	1o9,8	1o2,6	1o2,6	91,5	89,o	122,o
	1 mM CoA	-	2 N	37°C	-	-	1o2,6	1o6,3	1oo,9	89,o	95,o	96,6	96,o
2) Verseifungskurven:													
a) kinetischer Test:	183µM PCoA	1o mM	1 N	3o°C	11,o ±o,6	11,4 ±2,6	57,o ±3,o	76,5 ±o,9	93,o ±3,o	98,7 ±3,1	96,4 ±4,7	95,6 ±4,8	89,5 ±3,7
(extern)	354µM PCoA	13,3mM	o,81N	3o°C	39,7	28,4	7o,8	84,o	98,4	96,4	1o6,9	1o6,9	1o2,2
(intern)	354µM PCoA	13,3mM	o,81N	3o°C	3o,6	2o,3	72,o	81,9	1o6,o	83,8	113,o	96,o	97,2
b) Differenzspektrum:	767µM PCoA	9,5 mM	1,9N	37°C	-	o,o	-	-	77,9	81,6	134,4	-	-
	82oµM Stearyl-CoA	8 mM	1,6N	37°C	-	o,o	58,1	7o,4	85,8	93,2	115,6	6o,1	97,5
c) DTNB-Methode:	2683µM PCoA	-	3,33N	37°C	-	o,o	56,9	8o,2	9o,7	111,5	98,8	97,2	-
d) radiochemisch:	1-^{14}C-PCoA	-	o,95N	3o°C	-	39,2 ±7,3	68,5 ±9,9	84,4 ±16,3	97,4 ±4,2	1o3,6 ±8,6	1o1,3 ±3,8	1oo,2 ±1o,o	-

Tab.19: Übersicht über die aufgenommenen Verseifungskurven

Unter den gewählten Bedingungen erfolgt in allen Fällen in den ersten 5 min ein rascher Anstieg der freigesetzten Bruchstücke, woraufhin das den Vergleichssubstanzen CoA bzw. DTT entsprechende Plateau erreicht wird. Lediglich bei Messung mit dem kinetischen Test fällt die Verseifungskurve innerhalb von 6o min langsam wieder ab, was wahrscheinlich auf Veränderungen des CoA-Moleküls im alkalischen Medium zurückzuführen ist, auf die das Enzym Phosphotransacetylase wegen seiner hohen Spezifität sehr empfindlich reagiert. An der Menge der freigesetzten Fettsäure oder der SH-Gruppen ändert sich hingegen natürlich nichts mehr (Ausnahme: DTT wegen der Bildung des cyclischen Disulfids).

Für die ersten 2 min errechneten wir ungefähr übereinstimmende Werte zwischen 53 und 7o sec für die Halbwertszeit der Inaktivierung von PCoA und Stearyl-CoA bei 3o bis 37°C (zum Vergleich: Die Halbwertszeit der Inaktivierung von Acetyl-CoA in o,17 N KOH bei o°C beträgt nach (61) 21o sec.).

Diese Analogie der verschiedenen Verseifungskurven bedeutet, daß die Freisetzung von CoA, von Thiolgruppen, von freier Fettsäure sowie die Lösung der Thiolesterbindung in der Verseifungsmischung synchron erfolgen, was eine eindeutige Identifizierung der verseiften Verbindung als Acyl-CoA-Thiolester ermöglicht. Eine weitere Charakterisierung ist über die dünnschichtchromatographischen und UV-spektroskopischen Eigenschaften sowie über die anderen in 3.2. und 3.3. beschriebenen Tests möglich (vgl. auch 3.5.).

3.4. Synthese und Reinigung von LCFA-CoAs

3.4.1. Herstellung von LCFA-CoA-Verbindungen

In der Literatur sind mehrere nichtenzymatische und enzymatische Verfahren zur Synthese von Acyl-CoA-Thiolestern beschrieben. Nichtenzymatische Methoden sind:

a) die Bildung eines gemischten Anhydrids mit Monoäthylkohlensäure aus der jeweiligen Fettsäure und Chlorameisensäureäthylester (unter Zugabe von Pyridin zum Abfangen des Chlorwasserstoffs)

und Reaktion des gemischten Anhydrids mit CoA in Tetrahydrofuran/ Wasser bei pH 7,5 (7o):

(XXIIa) $R\text{-}COOH + C_2H_5\text{-}O\text{-}CO\text{-}Cl + C_5H_5N = C_5H_5NH^+Cl^- + R\text{-}CO\text{-}O\text{-}CO\text{-}O\text{-}C_2H_5$

(XXIIb) $R\text{-}CO\text{-}O\text{-}CO\text{-}O\text{-}C_2H_5 + CoASH = R\text{-}CO\text{-}SCoA + CO_2 + C_2H_5OH$

b) die Umsetzung von CoA mit Acylchlorid in einer Mischung von Wasser und Tetrahydrofuran bei pH 7,5 bis 8 nach (1o5) (der entstehende Chlorwasserstoff wird durch kontrollierte Zugabe von NaOH abgefangen):

(XXIII) $R\text{-}COCl + CoASH = R\text{-}COSCoA + HCl$

c) die Reaktion von CoA in Tetrahydrofuran mit O-Acyl-N-hydroxy-succinimid, das wiederum aus N-Hydroxysuccinimid und der betreffenden Fettsäure unter Zusatz von Dicyclohexylcarbodiimid (zum Abfangen des entstehenden Wassers) in trockenem Essigester hergestellt werden kann (1o6):

(XXIVa) N-Hydroxysuccinimid + R-COOH + Dicyclohexylcarbodiimid = = O-Acyl-N-hydroxysuccinimid + N,N'-Dicyclohexylharnstoff

(XXIVb) O-Acyl-N-hydroxysuccinimid + CoASH = R-COSCoA + N-Hydroxy-succinimid

Außerdem gibt es noch folgende enzymatische Syntheseverfahren:

d) Umsetzung von CoA mit Fettsäure und ATP, katalysiert durch eine Thiokinasepräparation aus Avocado-Mesocarp-Acetonpulver (1o7):

(XXV) $R\text{-}COOH + CoASH + ATP \xrightleftharpoons{Mg^{2+}} R\text{-}COSCoA + AMP + PP_i$

e) dieselbe Reaktion, katalysiert durch LCFA-CoA-Synthetase aus Rattenleber oder anderen tierischen Organen (1o8).

Wir synthetisierten LCFA-CoA-Thiolester i.a. nach Methode a), variiert nach (8o): Nach dieser Variation wird in wasserfreiem Tetrahydrofuran Triäthylamin statt Pyridin zum Abfangen des Chlorwasserstoffs zugegeben; nach 2 h bei -2o°C sind dichte Kristallnadeln von Triäthylammoniumchlorid ausgefallen. Die zweite Reaktion, die in wäßrigem Tetrahydrofuran bei Raumtemperatur abläuft,

ist insofern heikel, als ein enger pH-Bereich ständig durch Zugabe von $NaHCO_3$ eingehalten werden muß: Ist der pH-Wert zu niedrig, so läuft die Reaktion zu langsam ab; ist er zu hoch, so wird bereits gebildetes Acyl-CoA wieder hydrolysiert. Das Tetrahydrofuran beeinträchtigt die pH-Bestimmung mit Universalindicatorpapier; die pH-Kontrolle muß daher mit der Glaselektrode erfolgen.

In der Originalvorschrift wird die Inkubationsmischung mit $HClO_4$ angesäuert und anschließend lyophilisiert; hierbei wird ein Großteil der gebildeten Acyl-CoA-Verbindung zerstört. Günstiger ist es, mit der leichter flüchtigen Salzsäure anzusäuern; auf diese Weise konnten die Ausbeuten teilweise bis auf über 6o % gesteigert werden.

Im Acylteil radioaktiv markierte LCFA-CoAs wurden erhalten, indem vor der Umsetzung zum gemischten Anhydrid die eingesetzte Fettsäure bis zur gewünschten spezifischen Aktivität (i.a. etwa o,25 bis 1,5 µCi ^{14}C bzw. 4o µCi ^{3}H/µMol) mit der radioaktiven Fettsäure-Lösung (meist 1-^{14}C- oder 9,1o-^{3}H-Palmitinsäure) vermischt und das Lösungsmittel (Benzol oder Toluol) unter vermindertem Druck entfernt wurde. Die aus der Radioaktivität und aus dem UV-Spektrum bestimmten Ausbeuten an ^{14}C- oder ^{3}H-PCoA (nach erfolgter Reinigung; siehe unten) stimmten in allen untersuchten Fällen innerhalb der Fehlergrenzen miteinander überein.

Eine Vorreinigung des CoA durch Waschen mit Äthylmethylketon nach (1o9) erbrachte bei uns keine wesentliche Verbesserung im Hinblick auf Ausbeute und Reinheit der erhaltenen Acyl-CoA-Verbindungen.

3.4.2. Reinigung des synthetisch hergestellten PCoA mit Hilfe von Fällungs- und Ausschüttelverfahren

Die hier für PCoA (nicht markiertes, 1-^{14}C- und 9,1o-^{3}H-PCoA) gemachten Angaben gelten sinngemäß auch für andere LCFA-CoA-Verbindungen.

Bei dem in 3.4.1. beschriebenen Syntheseverfahren für PCoA fallen nichtumgesetzte Palmitinsäure und nichtumgesetztes CoA an,

bei anderen Verfahren, z.B. bei dem nach (1o5), auch noch weitere Nebenprodukte (etwa S-Palmityl-Thioglycolsäure, S-Palmityl-Glutathion usw.). Es muß daher eine Reinigung des Rohproduktes erfolgen, wobei wegen der Labilität von PCoA (insbesondere gegenüber Hitze und alkalischen pH-Werten) nur milde Bedingungen angewandt werden können. Man kann die verschiedenen Reinigungsverfahren grob in Fällungs- und Ausschüttelverfahren (Kapitel 3.4.2.) und in dünnschicht- und säulenchromatographische Verfahren (Kapitel 3.4.3.) einteilen.

In die erste Kategorie fallende Verfahren werden in (7o,8o, 81,85,1o5,11o) beschrieben. Sie beruhen meist auf der (relativen) Unlöslichkeit von PCoA in eiskalter verdünnter $HClO_4$ (in der CoA löslich ist) und in organischen Lösungsmitteln wie Aceton, Diäthyläther und Petroläther (in denen sich Palmitinsäure leicht löst). Da keine Extraktion und keine Flüssig-Flüssig-Verteilung absolut quantitativ verläuft, kommt es im Verlauf der Reinigung meist zu erheblichen Verlusten.

Wir gingen i.a. so vor, daß wir das mit HCl lyophilisierte Produkt (s.3.4.1.) mit $HClO_4$ versetzten, zentrifugierten, den Überstand abdekantierten und dieses Verfahren mit dem $HClO_4$-Niederschlag so oft wiederholten, bis der Überstand kein CoA mehr enthielt (nachgewiesen durch Fluoreszenzlöschung auf Dünnschichtplatten oder durch das UV-Spektrum); meistens genügte eine zweimalige Wiederholung. Dann wurde der Niederschlag mehrmals mit Petroläther extrahiert, der Aceton und Diäthyläther vorzuziehen ist, da diese Lösungsmittel immer auch etwas PCoA lösen. Eine Kontrolle der extrahierten Palmitinsäuremenge konnte nur bei radioaktiver Markierung erfolgen. Das Produkt wurde schließlich in einem leicht sauren Puffer aufgelöst (meist o,1 M Natriumacetat-Puffer pH 5,2) und der restliche Petroläther mit N_2 verblasen.

Es ist recht schwierig, bei dieser Fest-Flüssig-Extraktion ein sauberes Produkt zu bekommen, da die Palmitinsäure aus dem wasserhaltigen PCoA-Niederschlag wegen der mangelnden Benetzung durch den Petroläther nur schlecht zu extrahieren ist. Abb.4o zeigt die Radioaktivitätsverteilung eines so gereinigten, dabei immerhin 5mal mit Petroläther extrahierten 1-^{14}C-Lauryl-CoA-

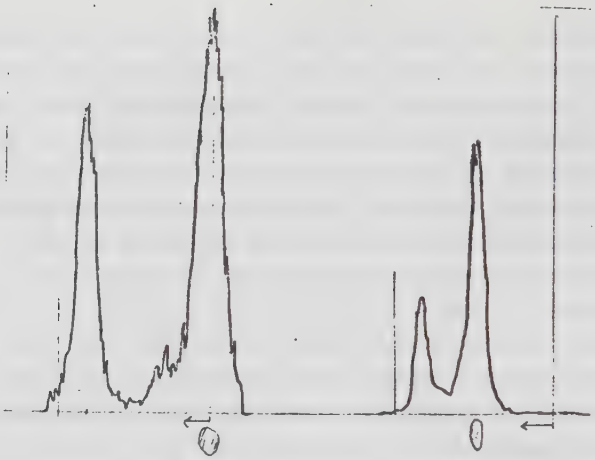


Abb.4o: $HClO_4$/Petroläther-gereinigtes 1-^{14}C-Lauryl-CoA
links: HPTLC Laufmittel B; rechts: HPTLC Laufmittel E
Laufrichtung: von rechts nach links

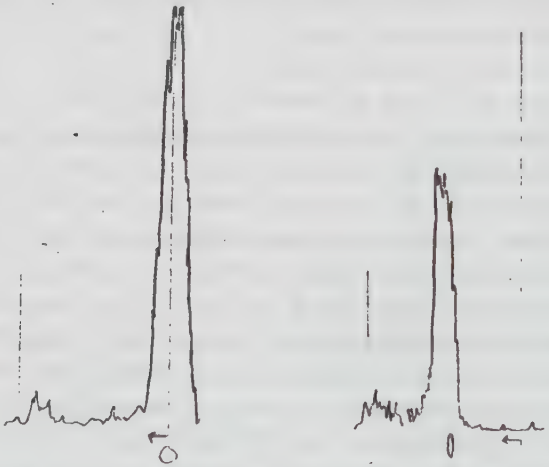


Abb.41: Nach (111) gereinigtes 9,1o-^{3}H-PCoA (Legende s.Abb.4o)

Präparats auf HPTLC-Platten nach Entwicklung in Laufmittel B und E; trotz der aufwendigen Reinigung sind immer noch erhebliche Mengen an 1-^{14}C-Laurinsäure vorhanden (in beiden Laufmitteln an der Front).

Bessere Ergebnisse erzielten wir mit der Flüssig-Flüssig-Verteilung nach (111), die ursprünglich für die Extraktion von freien

Fettsäuren aus Blutplasma entwickelt wurde. Das rohe Lyophilisat wurde in 1 Volumenteil Wasser gelöst und dann mit 5 Volumina der Mischung 1 N H_2SO_4:n-Heptan:Isopropanol = 1:1o:4o (v/v/v) versetzt. Nach Einstellung des Verteilungsgleichgewichts wurden 2 Volumina Wasser und 3 Volumina n-Heptan zugegeben und Ober- und Unterphase getrennt. Radioaktiv markierte Palmitinsäure, die zusammen mit Hefe- oder Leberextrakt eingesetzt wurde, befand sich nach dieser Prozedur zu 93,8 % (Hefe) bzw. 9o,3 % (Leber) in der Oberphase, PCoA zu 85,o % (Hefe) bzw. 74,9 % (Leber) in der Unterphase. Nach nur einmaliger Extraktion kann also ein wesentlich saubereres Produkt erhalten werden. Abb.41 zeigt die Radioaktivitätsverteilung eines nach (111) gereinigten 9,1o-^{3}H-PCoA-Präparats bei HPTLC in Laufmittel B und E; im Gegensatz zu Abb.4o liegt kaum noch markierte Fettsäure im Präparat vor.

Schließlich untersuchten wir noch die Anwendbarkeit der von Folch beschriebenen Methode zur Abtrennung von Nichtlipiden aus Lipidextrakten auf die Trennung von PCoA und Palmitinsäure. Nach (112) trennt sich ein Lipide enthaltendes Gemisch Chloroform: :Methanol:Wasser = 8:4:3, das normalerweise erhalten wird, indem man zu einem Lipidextrakt in Chloroform:Methanol = 2:1 im richtigen Verhältnis Wasser gibt (unter Berücksichtigung des im extrahierten Gewebe enthaltenen Wassers), in zwei Phasen auf, die im folgenden FUP (Folch-Oberphase) und FLP (Folch-Unterphase) genannt werden. Die FUP macht 4o %, die FLP 6o % des Gesamtvolumens aus; das Verhältnis Chloroform:Methanol:Wasser beträgt in der FUP 3:48:47, in der FLP 86:14:1. Beide Phasen können auch unabhängig von einer vorhergehenden Phasentrennung des 8:4:3-Gemisches hergestellt werden; man spricht dann von theoretischer FUP bzw. theoretischer FLP.

Folch wies nach, daß sich die meisten Lipide in der FLP ansammeln, während Nichtlipide in die FUP gehen. An 1-^{14}C-PCoA, das nach (111) völlig frei von 1-^{14}C-Palmitinsäure gemacht worden war, bestimmten wir einen Verteilungskoeffizienten von 3,97:1, das heißt daß PCoA zu 79,9 % in die FUP geht. In Lipidextrakten enthaltene Bestandteile können diese Verteilung jedoch erheblich stören (s.Kapitel 5.).

Schüttelt man 6o Teile FLP mit 4o Teilen theoretischer FUP aus (oder umgekehrt), so ändern sich weder die Volumina noch die Zusammensetzung der beiden Phasen. Durch mehrfaches Ausschütteln läßt sich daher im Prinzip die Ausbeute steigern, wenn dies auch für die Trennung von PCoA und Palmitinsäure kaum Bedeutung hat: Bei der einmaligen Folchtrennung von rohem 1-^{14}C-PCoA gingen 55,8 % der Ipm in die FUP, während 44,2 % in der FLP blieben. Beim zweiten Ausschütteln der FLP mit theoretischer FUP gingen nur noch 5,2 % der Ipm in die Oberphase (Gesamtwiederfindung 1o2,2 %), beim dritten Ausschütteln nur noch 2,2 % (Gesamtwiederfindung 97,3 %).

3.4.3. Reinigung des synthetisch hergestellten PCoA mit Hilfe dünnschicht- und säulenchromatographischer Verfahren

Neben den reinen Fällungs- und Ausschüttelverfahren können, insbesondere für die Isolierung von LCFA-CoAs aus komplexeren Mischungen, chromatographische Verfahren verwendet werden. Für die Reinigung von PCoA aus einem Syntheseansatz, in dem die Hauptverunreinigungen CoA und Palmitinsäure sind, genügen jedoch meist die in 3.4.2. beschriebenen Verfahren.

a) Papier- und Dünnschichtchromatographie

Die in 3.2.3. genannten papier- und dünnschichtchromatographischen Eigenschaften von PCoA können, unter Beachtung der Unterschiede zu seinen Bestandteilen CoA (s.2.5.1.b)) und Palmitinsäure (s.3.3.6.), zu seiner Reinigung ausgenutzt werden. Porter (81) beschreibt ein papierchromatographisches Reinigungsverfahren: Auf aufsteigende Chromatographie in Laufmittel F folgt die absteigende Elution mit Laufmittel H. In (1o8) wird die präparative Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel in Laufmittel E und die anschließende Elution der abgekratzten Schicht mit o,1 M Natriumacetat-Puffer pH 4,5 in 5o % Isopropanol beschrieben.

Wir verwendeten die präparative Dünnschichtchromatographie mit den in 3.2.3. angeführten Laufmitteln hauptsächlich zur Isolierung der LCFA-CoA-Fraktion aus biologischem Material (s.Kapitel 5.), weniger zur Reinigung von synthetischem PCoA. Hierbei wurden

außer präparativen Dünnschichtplatten auch Kieselgelplatten und -folien mit normaler Schichtdicke, Platten mit Kieselgur-Konzentrierungszone sowie HPTLC-Platten benutzt. Die Elution der abgekratzten Schicht erfolgte meist mit Laufmittel F oder mit Methanol; bei den dickeren präparativen Dünnschichtplatten wurde das abgekratzte Kieselgel (wegen der größeren Menge) zu einer kleinen Säule gepackt und in dieser Form eluiert.

b) Übertragung der dünnschichtchromatographischen Eigenschaften auf die Säulenchromatographie

Eine direkte Übertragung der dünnschichtchromatographischen Eigenschaften auf die Säulenchromatographie ist bei der sog. "Trockensäulenchromatographie" möglich, bei der ein spezielles Kieselgel in einen unten geschlossenen Nylonschlauch eingefüllt wird, die Probe oben aufgesetzt und das Laufmittel einsickern gelassen wird, bis das untere Ende des Schlauchs erreicht ist. Eine Elution erfolgt nicht. Die beiden Schlauchenden entsprechen hierbei der Start- und der Frontlinie in der Dünnschichtchromatographie, ihr Abstand einer Rf-Einheit. Die aufgetragenen Substanzen sollen nach (113) mit gleichen Rf-Werten wie bei der Dünnschichtchromatographie aufgetrennt werden. Ein Nachteil ist allerdings die geringe Geschwindigkeit sowie die schlechte Auflösung (bei komplexeren Mischungen).

Zur Abtrennung von 1-^{14}C-Palmitinsäure aus 1-^{14}C-PCoA eignet sich Laufmittel A, in dem letzteres am Start bleibt, während die Palmitinsäure ein Stück weit in das Kieselgel wandert. Bei Auftragung eines Gemisches erhielten wir durch Ausschneiden und Eluieren der Startzone tatsächlich 1-^{14}C-Palmitinsäure-freies 1-^{14}C-PCoA. In einem Versuch mit radioaktiver Palmitinsäure, bei dem die Säule in Abschnitte von ΔRf = 0,05 zerschnitten und mit Zählflüssigkeit eluiert wurde, befanden sich nur 0,9 % der eingesetzten Ipm im obersten Abschnitt (0 $\triangleq$ Rf $\triangleq$ 0,05), 7,0 % zwischen Rf = 0,05 und Rf = 0,1, aber 37,1 % zwischen Rf = 0,1 und Rf = 0,15 und 44,7 % zwischen Rf = 0,15 und Rf = 0,2. Die Lage der Radioaktivität auf der Trockensäule entspricht also tatsächlich derjenigen auf einer Dünnschichtplatte.

Wir versuchten auch eine Übertragung der dünnschichtchromatographischen Eigenschaften von 1-^{14}C-PCoA und 1-^{14}C-Palmitinsäure auf die Säulenchromatographie auf Kieselgel G mit Elution. In Laufmittel A bleibt PCoA am Start liegen, während Palmitinsäure bei genügend langer Laufzeit eluiert wird (84,6 % Ausbeute). Wechselt man nach vollständiger Elution der Palmitinsäure das Lösungsmittel (am besten Laufmittel E), so wird schließlich reines PCoA eluiert (71,o % Ausbeute). Die Reinheitsprüfung erfolgte dünnschichtchromatographisch.

Nach K.Sandhoff, persönliche Mitteilung, hat die Analogie zwischen Dünnschichtchromatographie und Säulenchromatographie jedoch auch Grenzen, insbesondere für die Auftrennung komplizierterer Mischungen. Das für Säulenchromatographie erhältliche Kieselgel zeigt ein wesentlich geringeres Auflösungsvermögen als das für die Dünnschichtchromatographie benutzte (kleinere theoretische Bodenzahl); wird letzteres jedoch für säulenchromatographische Zwecke verwendet, so lösen sich submikroskopische Partikel ab, die eine schwer zu entfernende Verunreinigung darstellen. In (76) wird zwar eine, wenn auch recht umständliche, Methode zur Entfernung von Kieselgelspuren aus PCoA beschrieben. Hierbei wird das PCoA-enthaltende Eluat über P_4O_{1o} getrocknet, in trockenem Methanol gelöst, zentrifugiert, die überstehende Lösung getrocknet und das Ganze so oft wiederholt, bis das Produkt vollständig in Methanol löslich ist. Auch in nach dieser Methode gereinigtem PCoA lassen sich jedoch mit Lichtstreuungsmessungen noch Kieselgelspuren nachweisen.

c) Elutionschromatographie auf Kieselgelsäulen

Jiménez (114) beschreibt eine säulenchromatographische Reinigung von PCoA auf Kieselgel, bei der die Probe in Chloroform: :Methanol = 3:1 aufgetragen wird und zunächst mit Chloroform, dann mit 1o % Methanol in Chloroform, 5o % Methanol in Chloroform und schließlich mit reinem Methanol eluiert wird. In (115) ist Chloroform durch Methylenchlorid und die stufenweise Elution durch einen konvexen Gradienten von Methanol in Methylenchlorid ersetzt. (In Wirklichkeit ist der Gradient mit Sicherheit verzerrt, da Kieselgel den Methanolanteil relativ stärker adsorbiert und daher für diesen ein höheres Retentionsvolumen aufweist.)

Bei der stufenweisen Ausführung soll PCoA bei 1o % Methanol in Chloroform, bei der Gradientenelution bei 2o bis 4o % Methanol in Chloroform bzw. Methylenchlorid eluiert werden, Palmitinsäure dagegen schon in reinem Chloroform bzw. Methylenchlorid.

Bei einer Nachprüfung durch uns ergab sich eine Bestätigung der Literaturangaben bei der Gradientenausführung (3o bis 4o % Methanol in Methylenchlorid; die begleitende 1-^{14}C-Palmitinsäure wurde schon im Methylenchlorid-Vorlauf eluiert); bei der stufenweisen Elution, die wir abwandelten, indem wir die Konzentration von Methanol jedesmal um 1o % erhöhten, trat der 1-^{14}C-PCoA-Gipfel jedoch ebenfalls erst bei 4o % Methanol in Chloroform auf.

d) Reinigung mit Hilfe von Sephadex

Ein Batch-Verfahren zur Entfernung von Wasser und Nichtlipidkontaminationen aus Lipidextrakten wurde in (116) beschrieben. Der Extrakt wird zusammen mit Sephadex G-25 zur Trockene gebracht und dann mit Chloroform, Methanol und Wasser gewaschen. 1-^{14}C-PCoA erschien bei uns zu 17 % im Chloroform-Eluat und zu je 33 % im Methanol- und Wassereluat, so daß weder Ausbeute noch Abtrennung von Palmitinsäure und anderen Lipiden befriedigten.

Ein weiteres Verfahren für die Reinigung des bei der PCoA-Synthese nach (8o) erhaltenen Lyophilisates ist die Chromatographie auf einer Sephadex G-5o-Säule in dem in (89) beschriebenen System. Das Sephadex quillt zunächst in einem 5 % Methanol enthaltenden o,2 M Pyridin-Acetat-Puffer pH 6,2 (wäßrige Phase), in dem auch die Probe aufgetragen wird. Die Elution der Palmitinsäure erfolgt durch Essigester, der mit wäßriger Phase gesättigt ist (organische Phase), die Elution des PCoA nach Lösungsmittelwechsel wieder durch die wäßrige Phase. Eine typische Auftrennung einer wenig 1-^{14}C-Palmitinsäure enthaltenden 1-^{14}C-PCoA-Präparation zeigt Abb.42. Leider sind weder Ausbeute noch Reinheitsgrad des erhaltenen Produktes besonders gut. Insbesondere wird ein Teil des PCoA bereits zusammen mit Palmitinsäure eluiert, da zu Beginn schon wäßrige Phase (also das Elutionsmittel für PCoA) vorhanden ist; außerdem kommt es durch den Lösungsmittelwechsel häufig zu Inhomogenitäten in der Säule, was die Auflösung ver-

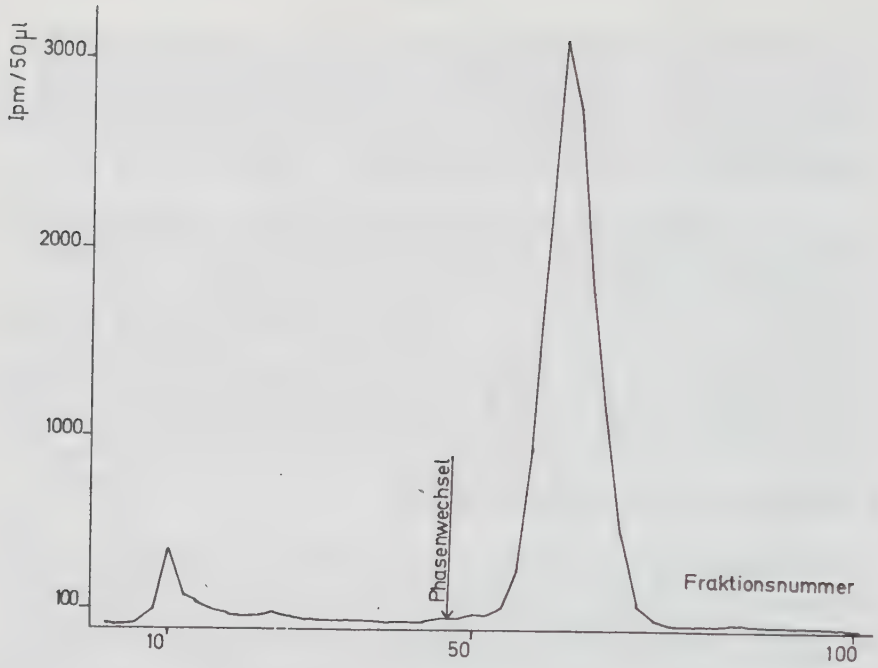


Abb.42: Reinigung von 1-^{14}C-PCoA auf einer Sephadex G-5o-Säule nach (89)

schlechtert. Allerdings kann sowohl die vor als auch die nach dem Phasenwechsel erhaltene Fraktion nochmals auf die gleiche Säule aufgetragen und so endgültig gereinigt werden.

e) Reinigung mit DEAE-Cellulose

In (118) ist die Auftrennung von Lipidextrakten über eine besonders vorbehandelte DEAE-Cellulose-Säule beschrieben. Mit Chloroform werden die Neutrallipide, mit Chloroform:Methanol = = 9:1 die Cholin enthaltenden, mit Chloroform:Methanol = 7:3 die Äthanolamin enthaltenden Phospholipide eluiert. Als weitere Lösungsmittel folgen Eisessig, Methanol und schließlich zur Elution der restlichen sauren Lipide eine mit konzentriertem NH_3 gesättigte Mischung Chloroform:Methanol = 2:1.

Wir trugen u.a. das in Abb.42 über eine Sephadex G-5o-Säule gereinigte 1-^{14}C-PCoA-Präparat auf eine solche DEAE-Cellulose-

Säule auf. Wie in Abb.43 zu sehen ist, erhielten wir einen scharfen Gipfel in der Eisessig-Fraktion. Die dünnschichtchromatographische Analyse in Laufmittel E (s.Abb.44) zeigt eine gegenüber dem nach (89) gereinigten Produkt sichtbar erhöhte Reinheit.

Im Gegensatz zu den Literaturangaben kann man die Elution erst bei einem Chloroform:Methanol-Verhältnis von 8:2 beginnen, da DEAE-Cellulose spezifisch leichter als Chloroform ist. Eine Kühlung der Säule ist nicht möglich, da der Eisessig sonst erstarrt. Aus diesen und anderen Gründen verwendeten wir die Säule trotz ihrer guten Handhabbarkeit nicht zur Abtrennung von LCFA-CoAs aus Lipidextrakten.

f) Versuchte Reinigung mit Hilfe einer Glaswollesäule

In (1o7) ist eine Glaswollesäule beschrieben, auf der enzymatisch hergestelltes (s.3.4.1.) und mit $HClO_4$ gefälltes PCoA gereinigt wird. Die Säule wird zunächst mit $HClO_4$ gewaschen (Fraktion I), dann mit 8o % Äthanol (Fraktion II), mit Äthanol:Äther =

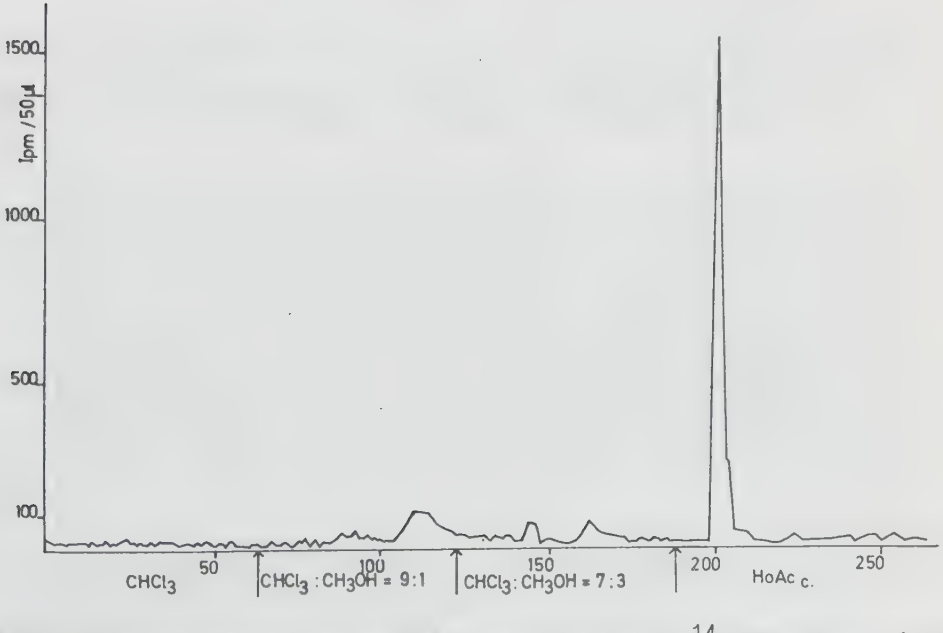


Abb.43: Nachreinigung des nach (89) gereinigten 1-^{14}C-PCoAs nach (118

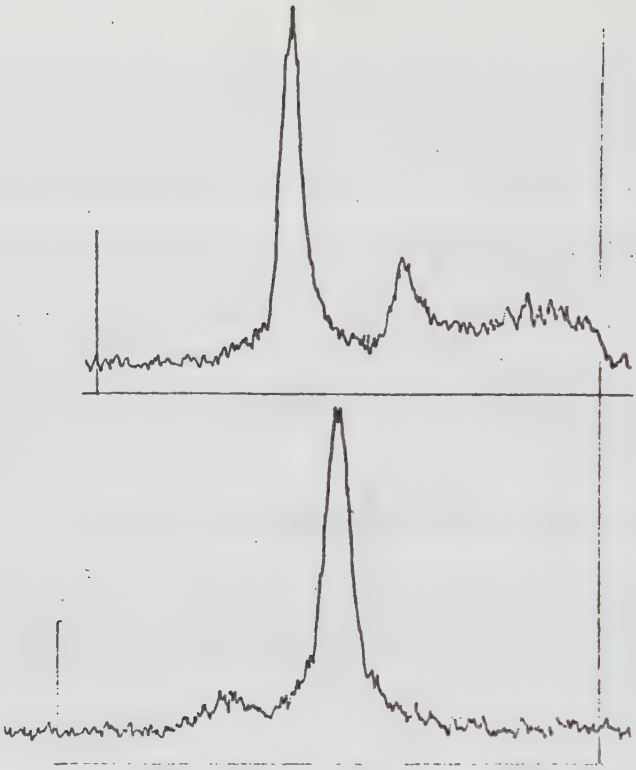


Abb.44: Radioaktivitätsverteilung bei Dünnschichtchromatographie in Laufmittel E
oben: Hauptgipfel aus Abb.42, unten: Hauptgipfel aus Abb.43
Laufrichtung: von rechts nach links

= 1:1 (Fraktion III); schließlich wird das PCoA mit Laufmittel H eluiert (Fraktion IV, nach Literaturangaben in 71,5 % Ausbeute). Bei einem entsprechenden Versuch mit nach (8o) hergestelltem 1-^{14}C-PCoA wurden jedoch 61,5 % des PCoA schon in Fraktion II eluiert, weitere 18,1 % in Fraktion III und nur 14,7 % in Fraktion IV (Gesamtwiederfindung 94,3 %). Anscheinend sind geringe Mengen mitgefällten Proteins für die beschriebene Auftrennung unerläßlich, womit das Verfahren für unsere Zwecke uninteressant wird.

3.5. Weitere Charakterisierung der LCFA-CoA-Verbindungen

3.5.1. Unterscheidung von S-Acyl-3'-Dephospho-CoA

Bei im Acylteil radioaktiv markierten Acyl-CoA-Verbindungen folgt schon aus dem Auftreten von Fluoreszenzlöschung und Radioaktivität am gleichen Fleck (in der Dünnschichtchromatographie), daß keine niedrigeren Bruchstücke als Acyl-3'-Dephospho-CoA vorliegen. Für die Radioaktivität ist hier allein der Fettsäureanteil, für die Fluoreszenzlöschung allein der Adeninbicyclus am entgegengesetzten Ende des Moleküls verantwortlich; wird eine andere Bindung als die Ribose-3'-phosphat-Bindung hydrolytisch gespalten, so werden also die für diese beiden Eigenschaften verantwortlichen Molekülteile in jedem Falle voneinander getrennt. Zwischen Acyl-CoA und Acyl-3'-Dephospho-CoA läßt sich auf diese Weise allerdings nicht unterscheiden. Im folgenden werden drei beweiskräftige Versuche zur Unterscheidung von der Dephospho-Verbindung angeführt:

In 3.3.7. wurde die Charakterisierung des LCFA-CoA-Moleküls als Thiolester, der CoA, Mercaptan und Fettsäure gebunden enthält, an Hand der in 3.3. angegebenen Verseifungskurven gezeigt. Daß es sich bei dem Thiolanteil um CoA und nicht um 3'-Dephospho-CoA handeln muß, geht aus dem kinetischen Test nach Verseifung hervor, da Phosphotransacetylase für CoA spezifisch ist.

Zusätzlich bestimmten wir noch den "Lipid-Phosphat"-Anteil einer selbst hergestellten PCoA-Lösung nach (119); er betrug 10,58 ± 0,25 mM (kein anorganisches Phosphat). Die aus der Extinktion bei 260 nm bestimmte Konzentration war 3,52 ± 0,43 mM, so daß das Verhältnis $\frac{\text{gebundenes Phosphat}}{\text{Adenin}}$ = (10,58 ± 0,25): :(3,52 ± 0,43) = (3,01 ± 0,07):(1,00 ± 0,12) beträgt (theoretisches Verhältnis 3,00 : 1,00). Wäre die Ribose-3'-Phosphat-Bindung teilweise hydrolysiert gewesen, so hätte das Verhältnis zwischen 2 und 3 liegen müssen; bei reinem Palmityl-3'-Dephospho-CoA wäre es genau gleich 2.

Schließlich wurde noch versucht, in präparativem Maßstab 1-^{14}C-Palmityl-3'-Dephospho-CoA aus 1-^{14}C-PCoA herzustellen. Für diesen

Zweck erschien nur das Enzym saure Phosphatase brauchbar, da es ein flaches Optimum bei pH 5,5 bis 6,1 aufweist, während im pH-Optimum der alkalischen Phosphatase (ca.9,8) die Thiolesterbindung des PCoA hydrolysiert wird.

Um die Bedingungen für eine Umsetzung herauszufinden, führten wir zunächst einige Vorversuche mit CoA durch. In Tab.2o ist die Abnahme des CoA-Gehaltes, gemessen mit Test b4 (Eichung mit externem Standard), in einem Inkubationsansatz mit saurer Phosphatase aus Kartoffeln dargestellt. Die Verwendung eines sauren Puffers war nicht notwendig, da CoA-Lösungen von sich aus bereits sauer sind.

Tab.2o: Dephosphorylierung von CoA: Verfolgung mit Test b4 (Tab.5)
Zusammensetzung der Inkubationsmischung:
1o mg ≙ 11,95 µMol CoA
+ o,2 mg ≙ o,4 U saure Phosphatase
+ 2 mg BSA
+ 1,o2 ml H_2O
Extinktionsänderung bei Ansatz ohne saure Phosphatase ≙ 1oo %

t	0	5min	1omin	2omin	3omin	4omin	5omin	1 h	2 h	3 h	1 d
%	89,o	88,2	83,5	82,7	76,o	6o,8	71,3	59,9	34,6	32,1	1,2

Nach 1 Tag wurden nur noch 1,2 % der ursprünglichen Extinktionsänderungsgeschwindigkeit im kinetischen Test gemessen; da Phosphotransacetylase nach (51) 3'-Dephospho-CoA noch mit ca. 1 % der CoA-Rate umsetzen soll, konnten wir davon ausgehen, daß die Umsetzung vollständig ist. Nach Ausfällung des Proteins mit TCA wurde das 3'-Dephospho-CoA isoliert und UV-spektroskopisch eine Ausbeute von 5o,9 % festgestellt. Die Rf-Werte im System Äthanol:o,5 N Ammoniumacetat = 3:2 auf Cellulose F254-Dünnschichtplatten stimmten ungefähr mit den Literaturwerten für 3'-Dephospho-CoA überein und waren deutlich von denen für CoA verschieden.

In ähnlicher Weise wurde nun 1-^{14}C-PCoA über Nacht mit saurer Phosphatase inkubiert, der mit TCA erhaltene Niederschlag mit Butanol:Äthanol:o,o3 M HCl = 1:1:1 extrahiert und das 1-^{14}C-

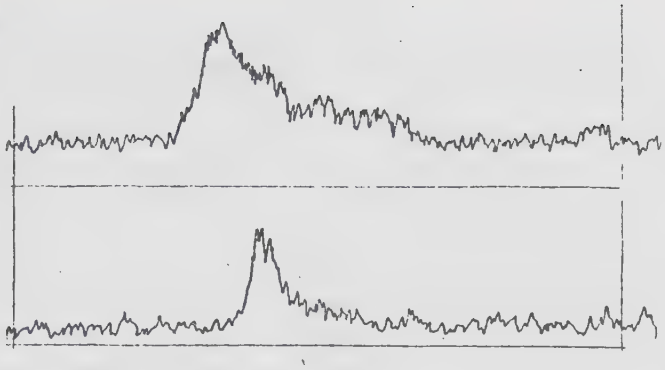


Abb.45: Dünnschichtchromatographie von 1-^{14}C-PCoA (unten) und 1-^{14}C-Palmityl-3'-Dephospho-CoA (oben) in Laufmittel E Laufrichtung: von rechts nach links

Palmityl-3'-Dephospho-CoA dünnschichtchromatographisch untersucht (Abb.45). Der 1-^{14}C-Palmityl-3'-Dephospho-CoA-Gipfel hatte zwar noch eine Schulter bei Rf = o,6o; jedoch stieg der Rf-Wert des Hauptflecks durch die Dephosphorylierung von o,6o auf o,65. Diese Reihenfolge ist auch zu erwarten, da die Rf-Werte in Laufmittel E allgemein mit fallender Polarität des Moleküls ansteigen: Rf(CoA) ‹ Rf(PCoA) ‹ Rf(Palmityl-3'-Dephospho-CoA) ‹ Rf(Palmitinsäure) (s.auch Rf-Werte der Phospholipide, Kapitel 5.). Es ist also eine eindeutige Unterscheidung der beiden Verbindungen möglich. Zudem hätte im Verlauf der Inkubation mit saurer Phosphatase gar keine Veränderung im dünnschichtchromatographischen Verhalten eintreten dürfen, wenn es sich bei unserem Präparat schon von vornherein um die Dephospho-Verbindung gehandelt hätte.

3.5.2. Detergenseigenschaften

a) Hemmung von Enzymreaktionen

Micellen- und Detergenseigenschaften der LCFA-CoA-Verbindungen sowie die damit verbundene Hemmung von Enzymreaktionen wurden bereits in den Kapiteln 1. und 3.1.2.d) erwähnt. Auf die Diskussion darüber, ob bei bestimmten Enzymen eine unspezifische oder spezifische Inhibierung vorliegt, soll hier nicht genauer eingegangen werden. Nach (23) liegt jedoch zumindest bei Acetyl-CoA-Carboxylase eine spezifische Hemmung vor (vgl.1.). Nach

G.L.Powell (12o,121) hemmen die von den entsprechenden Acyl-CoAs nur durch eine Etheno-Brücke im Adeninring unterschiedenen und daher auch etwa die gleiche CMC aufweisenden Analoga Palmityl- und Oleyl-(1,N^6-etheno)-CoA die Enzyme Citratsynthase und Malat-Dehydrogenase deutlich weniger stark als Palmityl- und Oleyl-CoA, so daß eine spezifische Wechselwirkung des Enzyms mit dem Adeninring vermutet werden kann. Nach (122) lassen sich Enzyme, die hauptsächlich monomere Substrate umsetzen (wie 1-Acylglycerin-3-Phosphat-Acyltransferase) von solchen, die Micellen umsetzen (wie Acyl-CoA-Hydrolase) dadurch unterscheiden, daß letztere bei Einsatz von PCoA (16:o) als Inhibitor ihre maximale, erstere dagegen ihre minimale Geschwindigkeit entfalten, verglichen mit den Geschwindigkeiten in Gegenwart von Acyl-CoAs anderer Kettenlängen.

Für unsere Messungen ist in diesem Zusammenhang von Bedeutung, daß größere Mengen PCoA die in Test b4 ablaufende gekoppelte Reaktion zum Erliegen bringen, so daß beispielsweise der CoA-Gehalt in PCoA-Präparaten nicht auf diese Weise gemessen werden kann. Bei Auftragung der reziproken Reaktionsgeschwindigkeit gegen die Hemmstoffkonzentration für verschiedene CoA-Konzentrationen (123) erhielten wir gekrümmte Kurven, die sich aus einem Plateau mit gleichbleibender Geschwindigkeit von o bis 2o µM PCoA und einem daran anschließenden ansteigenden linearen Stück zusammensetzen. Die "kritische Hemmkonzentration", d.h. die PCoA-Konzentration, ab der eine Hemmung beobachtet werden kann, liegt also für den im kinetischen Test verwendeten Ansatz bei etwa 2o µM. Zugabe von Serumalbumin hebt die Hemmung völlig auf (s.Abb.46), da es wie Acetyl-CoA-Carboxylase und andere Enzyme eine hohe Acceptorkapazität für LCFA-CoAs aufweist (27).

b) Bestimmung der kritischen Micellenkonzentration (CMC)

In (76) wird die Problematik der Bestimmung der CMC, der Micellengröße, der Einfluß der Vorbehandlung (z.B.Kieselgelchromatographie) auf diese beiden Größen sowie Einflüsse der Micellenbildung auf die pK-Werte der funktionellen Gruppen und auf die UV-spektroskopischen Eigenschaften diskutiert. Die aus Lichtstreuungsmessungen erhaltene CMC für PCoA ist 4 µM, die aus Farbstoffabsorptionsmessungen mit Pinacyanolchlorid erhaltene CMC ist 3,6 µM.

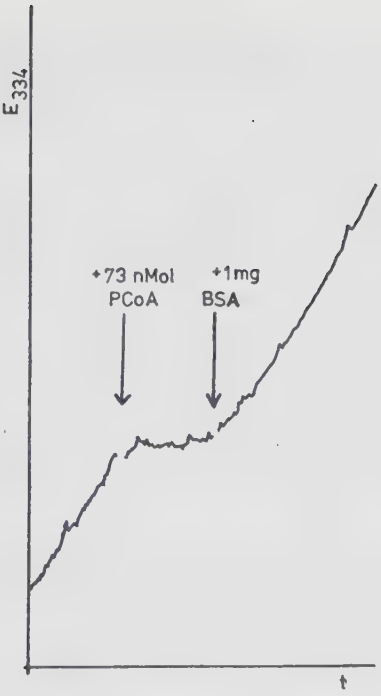


Abb.46: Hemmung von Test b4 (mit o,4 µg CoA) durch PCoA und Aufhebung der Hemmung durch BSA

Barden (122) gab die mit der Pinacyanolchlorid-Methode berechneten CMCs für LCFA-CoA-Verbindungen verschiedener Kettenlänge an (s.Tab.21). Mit dem Gang der K_i-Werte für die Acetyl-CoA-Carboxylase-Reaktion (Tab.4) besteht offenbar kein Zusammenhang, was wiederum auf eine spezifische Wechselwirkung hindeutet.

Wir benutzten für die Bestimmung der CMC von PCoA den Farbstoff Rhodamin 6G nach (12o), wählten jedoch gemäß (124) die halblogarithmische Auftragung (Extinktionsdifferenz bei 55o nm gegen den Logarithmus der Konzentration). Aus dem Schnittpunkt der Verlängerung des ansteigenden Astes der Kurve mit der Abszisse ergab sich eine CMC zwischen 2,8 und 3,9 µM PCoA, die gut mit den Literaturwerten übereinstimmt (s.Abb.47).

Tab.21: Mit der Pinacyanolchlorid-Methode bestimmte CMCs für LCFA-CoAs in 6,7 M Phosphat, 1o mM K^+, pH 6,9 (122) Es wurde die Klenk'sche Notation der Fettsäurereste verwendet (Erklärung s.5.3.).

LCFA-CoA-Verbindung	CMC (µM)
12:o	9,5
14:o	4
16:o	3,6
16:1w7	2
18:o	2
18:1w9	4,5
18:2w6	5,5

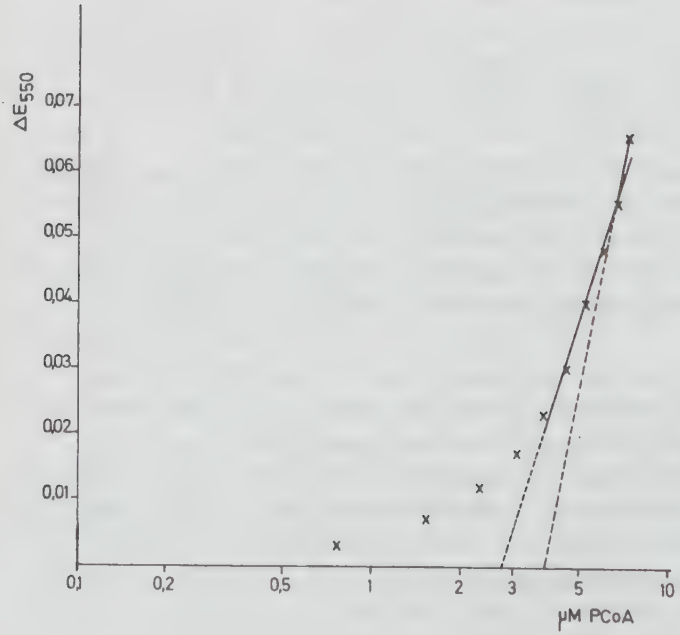


Abb.47: Bestimmung der CMC von PCoA

3.5.3. Bestimmung der Fettsäurereste in LCFA-CoA-Verbindungen

Eine dünnschicht- oder säulenchromatographische Auftrennung von Acyl-CoA-Verbindungen nach der Art des Fettsäurerestes ist bisher nicht beschrieben worden; wohl aber ist eine Überführung in eine andere Verbindungsklasse und deren chromatographische Auftrennung möglich. Bereits in 3.3.4. wurde die dünnschichtchromatographische Trennung der Acetylacylhydroxamate nach (1o1) erwähnt; eine ähnliche Methode mit $AgNO_3$-imprägniertem Kieselgel gibt es für die durch Hydrolyse erhältlichen freien Fettsäuren. In (125) ist die gaschromatographische Analyse der Isocyanatderivate der Acylhydroxamsäuren, in (126) die der Fettalkohole nach Reduktion mit Natriumboranat beschrieben.

Das am allgemeinsten anwendbare und auch für die Bestimmung der Fettsäurezusammensetzung in Lipiden als Routinemethode ausgearbeitete Verfahren ist jedoch die gaschromatographische Analyse der Fettsäuremethylester. Zu ihrer Herstellung müssen die LCFA-CoAs zunächst zu den freien Fettsäuren hydrolysiert werden. Dies gelingt spezifisch mit der nur Thiolester angreifenden Perameisensäure, die ihrerseits aus H_2O_2 und Ameisensäure hergestellt wird:

(XXVIa) $H_2O_2 + HCOOH = H_2O + HCO_3H$

(XXVIb) $R\text{-}COSCoA + 4\ HCO_3H = R\text{-}COOH + CoA\text{-}SO_3H + CO_2 + 3\ HCOOH$

Wenn keine kontaminierenden Lipide zugegen sind, genügt jedoch auch die alkalische Hydrolyse unter den in 3.3.1. angewandten Bedingungen. I.a. kann sogar davon ausgegangen werden, daß auch aus Glyceriden und Phospholipiden unter diesen milden Bedingungen keine Fettsäurereste abgespalten werden.

Auch für die Umsetzung der freien Fettsäuren zu den Methylestern gibt es zwei Standardverfahren: die Methylierung bei Raumtemperatur mit Diazomethan in ätherischer Lösung - CH_2N_2 muß jedesmal frisch z.B. aus N,N-Nitrosomethylharnstoff und Alkali hergestellt werden - und die Umsetzung mit methanolischem Bortrifluorid bei 1oo°C. Nach (127) ist die Diazomethan-Methode lediglich für hitze- oder säureempfindliche Fettsäuren vorzuziehen; mit polyungesättigten Fettsäuren sei keine Pyrazolinbildung oder

Bildung von Cyclopropanderivaten zu befürchten (bei anderen Autoren findet man allerdings auch die entgegengesetzte Aussage).

Wir zogen i.a. die BF_3-CH_3OH-Methode vor, da die Ausbeute bei der CH_2N_2-Methode zu wünschen übrig läßt und bei der Verwendung von nicht völlig peroxidfreiem Äther im Gaschromatogramm "Geisterpeaks" auftreten, die die Identifizierung von Fettsäuremethylestern mit höheren Kettenlängen (mehr als 2o C-Atomen) stark erschweren.

Einzelheiten über Derivatisierung und gaschromatographische Trennung der Fettsäuremethylester sind im experimentellen Teil beschrieben.

4. Bestimmung von CoA und LCFA-CoA-Verbindungen in biologischem Material

4.1. Allgemeines

4.1.1. Tötung der Versuchstiere und Aufarbeitung des biologischen Materials

Für die Tötung der Versuchstiere gibt es verschiedene Methoden: Der Einfluß verschiedener Narkotisierungsmethoden sowie der Tötung durch Genickbruch auf die in Rattenleber gemessenen Konzentrationen von Glykolyseintermediaten und verwandten Verbindungen werden in (128) diskutiert; dort wird die sog. "double-hatchet-Methode" empfohlen, die wir wegen der in (129) angedeuteten Schwierigkeiten jedoch nicht verwendeten. Wir töteten Mäuse durch Genickbruch, Ratten wurden nach Äthernarkose bis zur Muskelerschlaffung dekapitiert.

Auch für die Aufarbeitung biologischen Materials zum Zweck der Bestimmung von CoA-Verbindungen und anderen Metaboliten werden in der Literatur verschiedene Methoden beschrieben. In vitro-Inkubationssysteme werden schnell mit verdünnter $HClO_4$ bis zu einer Endkonzentration von 2 bis 5 % (w/v) gemischt. Bei Geweben, Organen o.ä. geht man zu Beginn immer so vor, daß das entnommene Material so schnell wie möglich eingefroren wird, da der Acylierungszustand von CoA sehr rasch wechseln kann (52). Bei tierischen Organen wird die sog.Frierstoppmethode empfohlen; da dieses Verfahren bei der geringen Anzahl der von uns verarbeiteten Mäuse- und Rattenlebern als zu aufwendig erschien (für Schweineleber wäre es ohnehin nicht verwendbar gewesen), froren wir diese Organe in flüssigem N_2 ein und lyophilisierten anschließend. Schweineleber wurde zunächst unter Eiskühlung homogenisiert und der entstandene Brei lyophilisiert. Für Leber ist ein rasches Abstoppen der post-mortem-Reaktionen besonders wichtig, da die meisten Enzymaktivitäten in diesem Organ höher sind als in anderen Organen; nach (130) werden beispielsweise Phospholipide in Leber bei 23°C bereits in 1 h vollständig abgebaut, während in Milz oder Niere noch nach 5 bis 8 h kaum Zersetzung zu beobachten ist.

Der Aufschluß von Hefe bereitet wegen der Widerstandsfähigkeit ihrer Zellwände Schwierigkeiten; verschiedene Aufschlußmethoden werden in Kapitel 4.2. miteinander verglichen.

Das gefrorene Gewebe bzw. die aufgeschlossene Hefe können nach zwei Standardverfahren enteiweißt werden: Entweder bereitet man durch Einbringen in kochendes Wasser, Abkühlen im Eisbad, Homogenisieren und Zentrifugieren einen Kochsaft (59,61), oder man homogenisiert in $HClO_4$, zentrifugiert und neutralisiert den Überstand mit KOH (131,79). Nach (49) liefert die Kochsaftmethode höhere CoA- und niedrigere Acetyl-CoA-Werte, was sich wahrscheinlich auf partielle Hydrolyse von Acetyl- und LCFA-CoA zurückführen läßt. Der Kochsaft ist meist trüb; hochtouriges Abzentrifugieren der suspendierten Partikel erniedrigt merkwürdigerweise den CoA-Wert. Aus diesen Gründen und auch deswegen, weil die $HClO_4$-Methode sich mit dem in 4.1.2. behandelten Säureaufschluß verbinden läßt, wurde letzterer der Vorzug gegeben.

4.1.2. Prinzip des Säureaufschlusses

Zur Bestimmung von CoA und LCFA-CoA-Verbindungen in dem so vorbehandelten biologischen Ausgangsmaterial müssen diese beiden Arten von Verbindungen, wie in 3.3.1. bereits ausgeführt, zunächst voneinander getrennt werden, da eine gleichzeitige Bestimmung in ein und derselben Lösung mit den zur Verfügung stehenden Tests nicht möglich ist. Diese Trennung geschieht am besten mit Hilfe des sog.Säureaufschlusses.

Das Prinzip des Säureaufschlusses ist bereits in den Kapiteln 3.1.2.d), 3.3.1. und 3.4.2. kurz erwähnt worden: CoA in reduzierter bzw. in oxidierter Form, also als Thiol CoA-SH bzw.als Disulfid CoA-S-S-CoA, sowie Acetyl-CoA, sind in kalter verdünnter Perchlorsäure löslich, LCFA-CoAs dagegen nicht. Der Säureaufschluß nutzt diese Tatsache zur Trennung dieser beiden Gruppen von CoA-Verbindungen voneinander aus. Im folgenden werden der Einfachheit halber die nach $HClO_4$-Fällung und Zentrifugation im Überstand verbleibenden CoA-Verbindungen als "lösliches CoA", die im Rückstand zurückbleibenden langkettigen Acyl-CoA-Verbindungen als "unlösliches CoA" bezeichnet. Das im $HClO_4$-Überstand enthaltene

lösliche CoA wird nach Neutralisation mit KOH, K_2CO_3, $KHCO_3$, Kaliumacetat oder $NaHCO_3$ direkt bestimmt; bei Verwendung von Kaliumsalzen fällt schwerlösliches $KClO_4$ aus, das abzentrifugiert werden muß. Das unlösliche CoA wird im Rückstand unter Zugabe eines SH-Schutzreagens (Glutathion, Thioglycol, DTT, DTE) alkalisch hydrolysiert und das entstandene freie CoA aus dem Niederschlag mit $HClO_4$ extrahiert und ebenfalls nach Neutralisation getestet.

Ins einzelne gehende Beschreibungen von Säureaufschlüssen mit und ohne Verseifung, die sich nur in Details, wie etwa Konzentration und Menge der $HClO_4$, unterscheiden, sind in (17,22,48, 5o,79,93,95,132,133,134) enthalten. Das von uns verwendete Verfahren ist in 6.4.1. beschrieben.

Nach (5o,79) ist die Vollständigkeit der Fällung der LCFA-CoA-Verbindungen von dem Grad der Unlöslichkeit in verdünnter Säure und damit von Länge und Sättigungsgrad des Acylrestes abhängig; nähere Erläuterungen dazu werden allerdings nicht gegeben. Sehr kleine Mengen an LCFA-CoAs, z.B. bei in vitro-Inkubationen, benötigen den Zusatz von Protein (z.B.BSA) für befriedigende Fällung. Bei der Ausführung des Säureaufschlusses soll kaum CoA zerstört werden; die in (79) angeführte CoA-Bestimmung führt allerdings zu Fehlern bis 2o %. Nach derselben Literaturstelle sollen auch nur etwa 5o % des gemessenen löslichen CoA tatsächlich aus CoA bestehen; der Rest enthält außer CoA-Disulfid und Acetyl-CoA auch gemischte Disulfide, z.B.mit Glutathion, sowie in geringerem Umfang Succinyl-CoA, Butyryl-CoA und weitere kurzkettige Acyl-CoA-Derivate.

4.2. Der Säureaufschluß

4.2.1. Aufschluß von Hefezellen

Für den Aufschluß von tierischen Zellen (Mäuse-,Ratten-,Schweineleber) genügen bereits Homogenisieren, Einfrieren und/oder Behandeln mit Säure oder organischen Lösungsmitteln (s.4.1.1.); für den Aufschluß von Hefezellen - wir verwendeten käufliche Bäckerhefe - sind wegen der Starrheit ihrer chitin- und hefeglucanhaltigen Zellwände drastischere Mittel erforderlich.

Bei verschiedenartigen Hefeaufschlüssen mit anschließender mikroskopischer Kontrolle zur Feststellung des Zellzertrümmerungsgrades beobachteten wir folgendes:

Wiederholtes Einfrieren in flüssigem N_2, Zerreiben im Mörser und Auftauen hatte auch nach dreimaliger Wiederholung keinen sichtbaren Effekt.

1minütige Beschallung einer 2 % (w/v) Hefesuspension in Wasser mit Ultraschall bei o°C ließ die Zellen ebenfalls anscheinend intakt, auch nach zehnmaliger Wiederholung.

Bei Aufschluß einer solchen Suspension im Manton-Gaulin-Zellhomogenisator war erst nach 4maliger Wiederholung ein Effekt zu sehen; nach dem 6.Mal waren immer noch ca.2o % ganze Zellen vorhanden, erst nach 7maligem Aufschluß konnten fast keine ganzen Zellen mehr gefunden werden.

a) Aufschluß mit Hilfe von Ultraschall

Da der Aufschluß im Zellhomogenisator größere Mengen Suspension erfordert, mußte für kleinere Mengen auch das Aufschlußverfahren mit Hilfe von Ultraschall genauer untersucht werden. Obwohl es nach der mikroskopischen Kontrolle so aussah, als ob bei Beschallung kein Aufschluß stattfinden würde, wurden doch in mit Ultraschall gewonnenen Hefeextrakten Proteine, CoA-Verbindungen, Lipide u.a. festgestellt. Wir verwendeten als leicht bestimmbares Maß für den Aufschlußgrad der Hefezellwände das aus den Zellen ausgetretene lösliche Protein. In Tab.22 ist die Proteinausbeute aus 9 g Preßhefe bei wiederholter 1minütiger Beschallung in 18 ml 1oo mM Kaliumphosphat-Puffer pH 6 bei o°C dargestellt, und zwar in Abhängigkeit von der Häufigkeit der Beschallungen, dem für das Ultraschallgerät verwendeten Aufsatz und von der Zugabe oder Nichtzugabe von 3 g Quarzsand pro Aufschluß.

Für die gewählten Bedingungen beobachtet man eine sehr starke Freisetzung von löslichem Protein nur bei Beschallung mit stumpfem Rüssel und Quarzsand; ein Unterschied zu der Proteinausbeute mit stumpfem Rüssel ohne Quarzsand tritt allerdings erst nach

Tab.22: Proteinausbeute (in mg) aus 9 g Preßhefe bei Beschallung in 18 ml 1oo mM Kaliumphosphat-Puffer pH 6 bei o°C, gemessen mit der Biuretmethode

Aufsatz auf das Ultraschallgerät	Quarzsand	wie oft beschallt (je 1 min)			
		1x	5x	1ox	15x
Mikrospitze	+	16,2	111,2	2o4,6	334,9
Mikrospitze	-	17,1	86,6	19o,9	287,9
stumpfer Rüssel	+	139,1	374,6	613,o	732,4
stumpfer Rüssel	-	182,2	187,3	238,o	-

mindestens 3maliger Beschallung auf. Die Mikrospitze schließt in derselben Zeit nur etwa 1/1o dieser Menge auf; mit diesem Aufsatz ist bei Zusatz von Quarzsand keine wesentliche Ausbeuteerhöhung zu beobachten.

Wie im experimentellen Teil beschrieben, wurde für den Säureaufschluß von frischer Hefe diese i.a. unter flüssigem N_2 zerrieben, gewogene Aliquote mit 6 % eiskalter $HClO_4$ versetzt (TCA hat etwa die gleiche Wirkung), zur Extraktion der löslichen CoA-Verbindungen 1 min lang beschallt und zentrifugiert. Zweimalige Beschallung oder eine Verlängerung der Beschallungsdauer auf bis zu 15 min ergaben keine höheren CoA-Werte; eine Beschallung von 1 min Dauer ist demnach - allerdings nur im Zusammenwirken mit der aufschließenden und denaturierenden Wirkung der Perchlorsäure - ausreichend. Dagegen führt eine mehrmalige Behandlung mit frischer $HClO_4$ zu höheren Ausbeuten (vgl.4.2.2.).

b) Aufschluß mit dem Manton-Gaulin-Zellhomogenisator

Um die Brauchbarkeit des Manton-Gaulin-Zellhomogenisators (Trivialname: "French Press") für die Messung von CoA-Verbindungen in Hefe zu untersuchen, bestimmten wir den Verlust an Trockenmasse sowie an löslichem und an unlöslichem CoA, indem wir die Suspension, die ursprünglich 8o g Frischgewicht ≙ 21,9 g Trockenmasse in 4 l Wasser enthielt, nach jedem Homogenisator-Durchlauf zentrifugierten, den Überstand lyophilisierten und einen Säure-

aufschluß durchführten, während der Rückstand im ursprünglichen Volumen Wasser neu aufgeschlämmt und nochmals homogenisiert wurde. Die Ergebnisse sind in Tab.23 dargestellt.

Tab.23: Verluste bei mehrmaligem Aufschluß von 8o g NG Hefe im Manton-Gaulin-Zellhomogenisator
1oo % Trockenmasse ≙ 21,9 g TG

Durchläufe im Homogenisator	o	1	2	3	4	5
% Trockenmasse verloren	o	1,1	38,7	58,6	67,1	73,o
lösliches CoA verloren (nMol/g TG)[x]	o	1,95	3,43	6,56	7,o2	7,o2
unlösliches CoA verloren (nMol/g TG)[x]	o	1,o3	2,o3	3,19	3,83	3,83

[x]Die Werte für lösliches und unlösliches CoA beziehen sich auf 1 g ursprünglich vorhandene Trockenmasse (Normalwerte s.4.3.2.). (Test b4 aus Tab.5; externer Standard)

In zwei weiteren Versuchen stellten wir eine Bilanz der Verteilung von löslichem und unlöslichem CoA nach einem Homogenisator-Durchlauf auf, indem wir nicht nur den lyophilisierten Überstand des zentrifugierten Homogenats, sondern auch den Rückstand einem Säureaufschluß unterwarfen. Die Ergebnisse werden in Tab.24 mitgeteilt.

Tab.24: Verteilung der CoA-Verbindungen nach einmaligem Aufschluß von 4o g NG Hefe im Manton-Gaulin-Zellhomogenisator

	TG vorher	TG nachher	TG-Verlust	Homogenats-Rückstand		Homogenats-Überstand	
				lösliches CoA (nMol/g TG)[x]	unlsl. CoA (nMol/g TG)[x]	lösliches CoA (nMol/g TG)[x]	unlsl. CoA (nMol/g TG)[x]
Exp.1	11,3 g	1o,9 g	3,3 %	15,6 ± 1,o (5)	11,9 ± 1,6 (5)	1,9 ± o,4 (5)	o,8 ± o,3 (5)
Exp.2	15,4 g	13,1 g	14,9 %	8,8 ± 1,7 (5)	11,6 ± 3,o (5)	o,6 ± o,3 (5)	o,5 ± o,3 (5)

[x]siehe Legende zu Tab.23

Die nach einmaligem Homogenisator-Durchlauf übergegangene Menge an CoA-Verbindungen ist nicht sehr bedeutend, so daß aus dem Homogenats-Rückstand noch richtige Werte für den Gehalt der Hefe an unlöslichem CoA erhalten werden. Die Werte für lösliches CoA sind allerdings zu niedrig; eine Erklärung hierfür wurde nicht gefunden. Es ist aber denkbar, daß LCFA-CoAs durch ihre hohe Affinität zu Membranen besser vor lysosomalen Enzymen geschützt sind als CoA, so daß letzteres schneller abgebaut wird (vgl.die ähnliche Beobachtung bei der Verarmung von Hefe in 4.3.3.).

c) Kombination der Aufschlüsse nach a) und b)

Wegen der prozentual besonders für unlösliches CoA beträchtlichen Verluste sollte der Aufschluß im Zellhomogenisator nicht zu häufig wiederholt werden. Andererseits wird ein vollständiges, d.h.auch mikroskopisch sichtbares Auslaufen der Zellen erst nach 7maligem Durchlauf erreicht. Dies veranlaßte uns, die beiden beschriebenen Aufschlußverfahren miteinander zu kombinieren, indem wir Hefe nur einige Male im Zellhomogenisator aufschlossen, das gesamte Homogenat ohne vorherige Zentrifugation lyophilisierten und bei -2o°C als "FPP n" aufbewahrten (FPP bedeutet "French-Press-Pulver", n die Zahl der Durchläufe), bis es für Säureaufschlüsse oder Extraktionen gebraucht wurde, die dann mit Beschallung in $HClO_4$, TCA oder einem Extraktionsmittel eingeleitet wurden.

Bei der Untersuchung verschiedener FPP n erhielten wir mit steigendem n fallende Werte für den Gehalt an CoA-Verbindungen, z.B.von 5o,1 nMol löslichem CoA/g TG bei FPP 1 auf 15,o nMol löslichem CoA/g TG bei FPP 7 (min internem Standard gemessen). Der in Tab.23 gezeigte Übergang von CoA-Verbindungen zusammen mit anderen Zellbestandteilen in den Überstand kann hier nicht dafür verantwortlich gemacht werden, weil zwischen den einzelnen Homogenisatordurchläufen nicht abzentrifugiert wurde; wahrscheinlich werden CoA-Verbindungen durch den hohen Druck (5oo atm), die kurzzeitige Erwärmung beim Aufschluß (bis auf 3o°C) und durch die Wirkung abbauender Enzyme zerstört.

4.2.2. Verfolgung der einzelnen Schritte des Säureaufschlusses

Sowohl das von vornherein als CoA vorliegende lösliche CoA als auch das durch die Verseifung erst in CoA übergeführte unlösliche CoA werden im Verlauf des Säureaufschlusses in perchlorsaure Lösung extrahiert. Daher muß gewährleistet sein, daß sich CoA in dieser Lösung, zumindest bei den während des Aufschlusses angewandten Temperaturen um o°C, nicht zersetzt. Diese Gefahr ist aber schon von vornherein als gering zu veranschlagen, da bereits in 2.3.3. in o,5 N HCl auch bei wesentlich höherer Temperatur (3o°C) nur eine geringfügige Abnahme des CoA-Gehalts der Lösung gemessen werden konnte. Tatsächlich wurde in 6 % $HClO_4$ bei o°C zumindest innerhalb von 6o min keine signifikante Änderung des CoA-Gehalts festgestellt (s.Tab.25).

Tab.25: Beständigkeit von CoA in 6 % $HClO_4$ bei o°C
(relative Werte; Gehalt bei t = o min ≙ 1oo %)
Die Messung erfolgte mit Test b4 aus Tab.5, externer Standard; das aus den mit $KHCO_3$ neutralisierten Inkubationsmischungen ausgefallene $KClO_4$ mußte zunächst abzentrifugiert werden.

t	o min	5 min	1o min	2o min	3o min	6o min
Neutralisation mit $NaHCO_3$	1oo,o	1o4,6	1o3,o	87,1	1o4,6	1o1,9
Neutralisation mit $KHCO_3$	1oo,o	1o2,o	1oo,9	1o3,5	94,5	1o5,7

Die Trennung von löslichem und unlöslichem CoA durch die $HClO_4$-Fällung ist naturgemäß nicht quantitativ. Es wird weder das gesamte LCFA-CoA im $HClO_4$-Niederschlag noch das gesamte CoA im $HClO_4$-Überstand wiedergefunden. Bei Zugabe von 9438 Ipm 1-^{14}C-PCoA zu 2 g Naßgewicht Hefe, Fällen und dreimaligem Waschen mit je 5 ml $HClO_4$ unter Ultraschallbehandlung gingen 1,1 % der Radioaktivität in den 1., 2,7 % in den 2., 3,5 % in den 3. und 2,7 % in den 4.$HClO_4$-Überstand; weitere Versuche ergaben ähnliche Werte.

Ebenso ist auch im $HClO_4$-Niederschlag noch lösliches CoA okkludiert, das sich durch mehrmaliges Waschen mit $HClO_4$ allerdings nahezu vollständig extrahieren läßt. Quantitative Entfernung des

löslichen CoA aus dem Niederschlag ist nicht nur deswegen erforderlich, weil sonst zu wenig lösliches CoA gemessen wird, sondern auch, weil zurückgebliebenes CoA sonst zusammen mit dem verseiften unlöslichen CoA gemessen wird, was zu zu hohen Werten für unlösliches CoA führt. Bei einem Versuch mit der gleichen Menge Hefe wie oben, Fällen mit 1o ml 6 % $HClO_4$ und 3mal Waschen mit je 2 ml $HClO_4$ wurden im 1.$HClO_4$-Extrakt 51,7 ± 3,8 (4), im 2. 6,6 ± o,6(4), im 3. 2,o ± o,3(4) und im 4. Extrakt nur noch vernachlässigbare o,3 ± o,3(4) nMol lösliches CoA/g TG gefunden, so daß die Summe (6o,6 nMol/g TG) dem wahren Gehalt dieser Hefecharge an löslichem CoA entspricht.

Der Verseifungsschritt bereitet in Bezug auf Vollständigkeit normalerweise keine Probleme; unter den im experimentellen Teil angegebenen Bedingungen (pH ca.12 bei 3o°C) reichen 3o min Verseifungsdauer aus. Bei einem Kontrollversuch mit Verdoppelung der Verseifungsdauer erhielten wir innerhalb der Fehlergrenzen den gleichen Gehalt an unlöslichem CoA.

Da der bei der Verseifung entstehende gelatinöse Niederschlag bei der weiteren Aufarbeitung Schwierigkeiten bereitet, ist es ratsam, nochmals mit $HClO_4$ anzusäuern und erst dann zu zentrifugieren. Natürlich bleibt auch jetzt wieder durch die Verseifung aus unlöslichem CoA entstandenes freies CoA im Niederschlag haften, was wegen der absolut meist geringeren Menge an LCFA-CoAs hier einen prozentual größeren Fehler verursacht als bei der Bestimmung von löslichem CoA. Auch hier muß also mit $HClO_4$ nachextrahiert werden, wenn es auf vollständige Erfassung des unlöslichen CoA ankommt. Aus einer FPP 3-Präparation erhielten wir beispielsweise bei der 1.$HClO_4$-Extraktion 17,o, nach der 2.Extraktion 24,8 nMol unlösliches CoA/g TG.

Schließlich sind noch in Abb.48 die aus einem FPP 1-Präparat bei den verschiedenen Stufen des Säureaufschlusses erhaltenen CoA-Mengen zusammenhängend dargestellt (absolute Mengen, da Eichung mit internem Standard). Eine in der Abbildung ebenfalls enthaltene "Nachverseifung" nach 3maliger $HClO_4$-Extraktion des "Verseifungsniederschlags" ergab auch keine höhere Ausbeute, als sie durch eine 4.$HClO_4$-Extraktion erzielt worden wäre (extrapoliert);

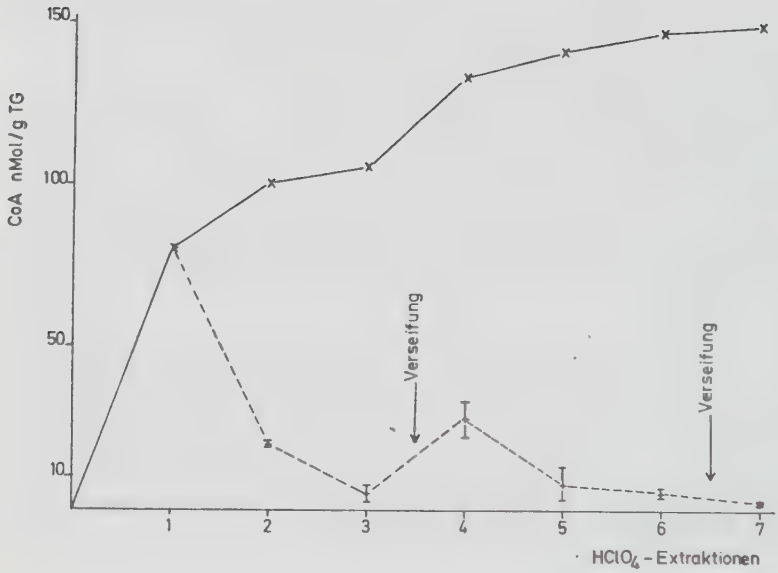


Abb.48: Verlauf des Säureaufschlusses von FPP 1
Test b4; Eichung mit internem Standard
x——— insgesamt extrahiert
+---- bei jedem Schritt extrahiert

dies ist ein Zeichen dafür, daß die Verseifung tatsächlich vollständig war (vgl.oben).

4.2.3. Wiederfindung von CoA und PCoA im Säureaufschluß ohne Hefe

Auf die Problematik der Bestimmung von CoA mit Hilfe der Phosphotransacetylase/Citratsynthase/Malat-Dehydrogenase-Methode (Test b4 aus Tab.5) in Lösungen mit störenden Metaboliten oder Ionen ist bereits ausführlich in den Kapiteln 2.3.4. und 2.3.6. eingegangen worden. Man hat insbesondere mit Störungen durch die durch Säureextraktion, alkalische Verseifung und Neutralisation der sauren Überstände in die Aufschlußprobe hereingebrachten Ionen zu rechnen; dies sind i.a. Na^+, K^+, ClO_4^- und CCl_3COO^-, je nachdem, ob man mit $HClO_4$ oder TCA fällt, mit $NaHCO_3$ oder $KHCO_3$ neutralisiert und mit NaOH oder KOH verseift. Durch die

Wahl der Kombination $HClO_4/KHCO_3$ (bzw. für die Verseifung $KOH/HClO_4$) läßt sich die Störung am geringsten halten, da $KClO_4$ ausfällt und die Ionenstärke der Lösung dadurch vermindert wird; dies bedingt allerdings nach der Neutralisation einen zusätzlichen Zentrifugationsschritt, wodurch die Ausbeute verringert wird.

Um diese Verhältnisse anschaulicher zu machen, sind in Abb.49 die Ergebnisse mehrerer Wiederfindungsversuche ohne Hefe für die Kombinationen $KHCO_3/HClO_4$, $NaHCO_3/HClO_4$, $KHCO_3$/TCA und $NaHCO_3$/TCA graphisch dargestellt. Hierbei wurden die auf der Abszisse angegebenen Mengen CoA mit 1o ml der jeweiligen o,6 N Säure versetzt und mit dem entsprechenden Alkalihydrogencarbonat neutralisiert. Die Wiederfindung ist bei Verwendung von $KHCO_3$ trotz der erforderlichen zusätzlichen Zentrifugation in allen Fällen höher.
In Bezug auf die Anionen läßt sich durch Vergleich der Kombinationen $NaHCO_3$/TCA und $NaHCO_3/HClO_4$ mit etwa gleicher Konzentration des gleichen Kations sagen, daß das Perchlorat-Anion etwas stärker als das Trichloracetat-Anion hemmt.

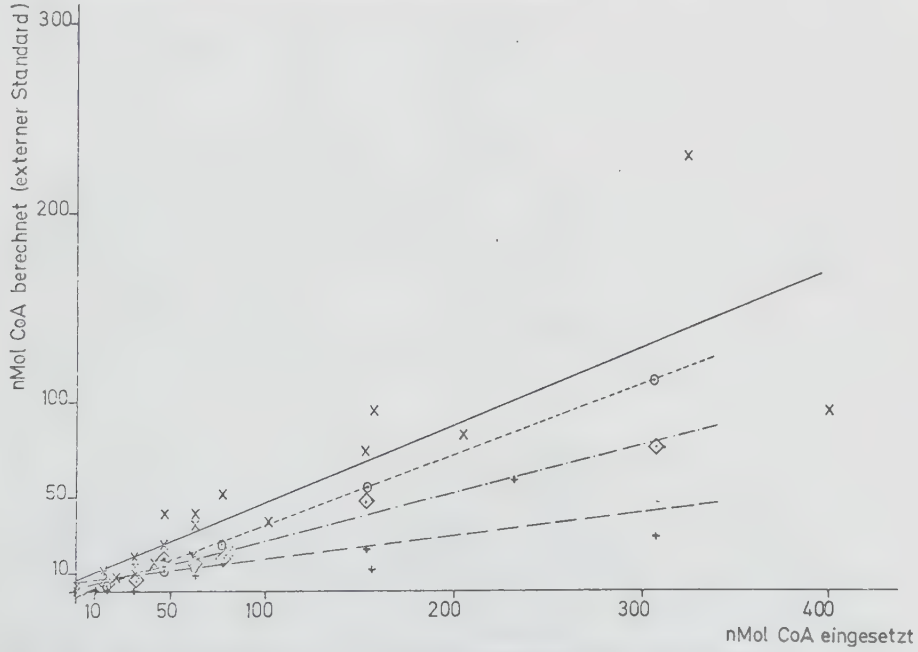


Abb.49: Wiederfindung von CoA im Säureaufschluß ohne Hefe
(Test b4 aus Tab.5, externer Standard)
x—— $KHCO_3/HClO_4$ (41,2 % Wiederfindung)
+--- $NaHCO_3/HClO_4$ (12,4 % Wiederfindung)
o····· $KHCO_3$/TCA (37,4 % Wiederfindung)
⊡-·-·- $NaHCO_3$/TCA (25,4 % Wiederfindung)

Ein entsprechender Versuch mit Messung nach der in 2.4. entwickelten Phosphotransacetylase/Arsenolyse/Hydroxamsäure-Methode (Test b3 aus Tab.5) ergab für die Kombination $KHCO_3/HClO_4$ 78,1 % Wiederfindung; für $NaHCO_3/HClO_4$ versagte dieser Test völlig: Alle Werte bewegten sich im Blindwertbereich.

Ähnliche Wiederfindungskurven wurden bei Einsatz von PCoA (mit 1o mg BSA als Träger), für unlösliches CoA (Säurefällung und Verseifung des Rückstands) sowie für Gesamt-CoA (durch direkte Verseifung) erhalten. Da im $HClO_4$-Überstand kein lösliches CoA nachgewiesen werden konnte, entspricht das Verhältnis von unlöslichem zu Gesamt-CoA dem Fällungsgrad von PCoA in $HClO_4$; er betrug 9o,o %, d.h. 1o % des PCoA blieben in Lösung (größenordnungsmäßige Übereinstimmung mit den in 4.2.2. gemachten Angaben).

4.2.4. Wiederfindung von CoA und PCoA im Säureaufschluß mit Hefe

In Tab.26 sind die Ergebnisse einiger Versuche dargestellt, bei denen wir CoA, PCoA oder mit CoA kontaminiertes PCoA zu 2 g Naßgewicht Hefe gaben und anschließend den Säureaufschluß mit der Kombination $KHCO_3/HClO_4$ durchführten. Aus der Differenz zu dem arithmetischen Mittel der Kontrollwerte (mit Hefe ohne Zusatz von CoA-Verbindungen) läßt sich die Wiederfindungsrate berechnen. Wegen der unvermeidbaren Unterschiede in der Aufarbeitung auch von Parallelproben und der zahlreichen genannten Störungsmöglichkeiten ist die Streuung der Versuchswerte teilweise beträchtlich. Insbesondere sehr kleine CoA-Mengen als Verunreinigung in PCoA lassen sich kaum mehr erfassen (z.B. Exp.4, 5 in Tab.26); wegen der notwendigen Differenzbildung können teilweise sogar negative Werte auftreten.

Abb.5o zeigt schließlich noch die Wiederfindung steigender PCoA-Mengen als unlösliches CoA bei Zugabe zu 2 g Naßgewicht Hefe mit anschließendem Säureaufschluß. Wegen der vorangegangenen negativen Erfahrungen mit den $NaHCO_3$ enthaltenden Kombinationen (s.Abb.49) wurden nur die Paare $KHCO_3/HClO_4$ und $KHCO_3$/TCA ausprobiert. Trotz der starken Streuungen ist der Vorteil der Kombination $KHCO_3/HClO_4$ offensichtlich.

	nMol CoA/g NG zugegeben x	nMol PCoA/g NG zugegeben y	nMol CoA/g NG vorher x_1	nMol CoA/g NG nachher x_2	x_2-x_1 Δx	Δx in % von x	nMol PCoA/g NG vorher y_1	nMol PCoA/g NG nachher y_2	y_2-y_1 Δy	Δy in % von y
Exp.1	5o	-	15,2±4,3(2)	7o,4±11,8(3)	55,2	11o,4	6,o±1,7(2)	9,7± 1,6(3)	3,7	-
Exp.2	5,8	45,4	13,3±1,2(3)	14,5± o,4(3)	1,2	2o,7	3,7±o,3(3)	47,6± 2,4(3)	43,9	96,7
Exp.3	5,8	45,4	11,7±o,9(3)	17,2± 1,1(3)	5,5	94,8	3,6±o,9(3)	54,6± 4,4(3)	51	112,3
Exp.4	o,58	4,54	11,7±o,6(3)	1o,7± o,3(3)	-1	-	2,5±o,3(3)	6,1± o,5(3)	3,6	79,3
Exp.5	o,96	7,47	13,9±2,6(2)	2o,1±1o,1(2)	6,2	-	2,2±o,5(2)	6,8± o,8(2)	4,6	61,6
Exp.6	o,96	7,47	13,9±2,6(2)	17,1± 2,4(2)	3,2	-	2,2±o,5(2)	7,1± o,1(2)	4,9	65,6
Exp.7	-	5	22,2±8,3(2)	17,9± 5,4(3)	-4,3	-	2,5±o,5(2)	8,9± 3,1(3)	6,4	128
Exp.8	-	8o,5	-	-	-	-	4,2±1,8(2)	55,o±16,4(3)	5o,8	63,1
Exp.9	1,55	9,4	-	-	-	-	8,7±1,o(2)	12,8± 1,6(2)	4,1	43,6
Exp.1o	3,1	18,8	-	-	-	-	8,7±1,o(2)	16,7± 2,4(2)	8,o	42,6

Tab.26: Wiederfindung von CoA und PCoA im Säureaufschluß mit Hefe
(Test b4 aus Tab.5; externer Standard)

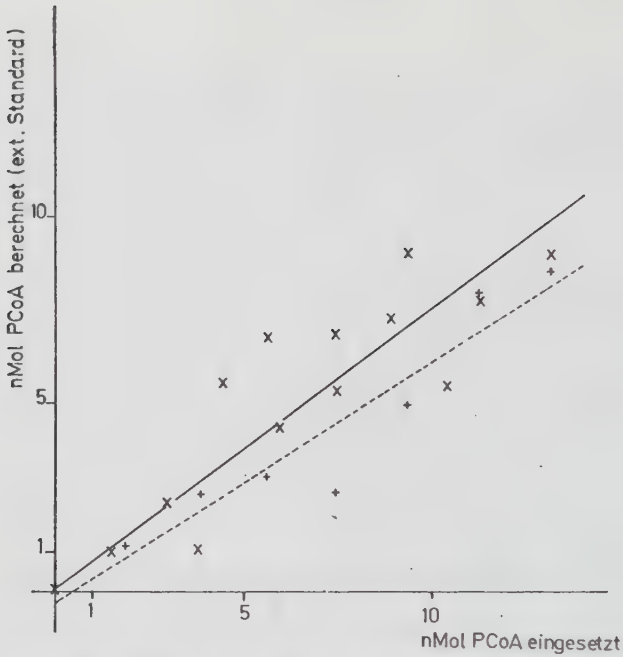


Abb.5o: Wiederfindung von PCoA im Säureaufschluß mit Hefe (Test b4 aus Tab.5, externer Standard)
x—— $KHCO_3/HClO_4$ (75,o % Wiederfindung)
+---- $KHCO_3$/TCA (64,1 % Wiederfindung)

4.2.5. Ergebnisse des Säureaufschlusses von Hefe in Abhängigkeit von Menge und Art der zugesetzten Kationen und Anionen

a) Eichung mit externem Standard

Man erhält mit dem Säureaufschluß von Hefe oder auch anderen Materialien mit dem kinetischen Test bei Eichung mit externem Standard verschiedene Ergebnisse für den Gehalt an löslichem CoA, je nachdem, welche Kombination Säure/Neutralisationsmittel man verwendet und welche Konzentration die zugesetzte Säure hat. Dies wird durch die in Tab.27 angegebenen Werte veranschaulicht.

Der Gang der Werte für lösliches CoA ist eindeutig: Die Kombination $KHCO_3/HClO_4$ führt zu den höchsten Werten, während $NaHCO_3/HClO_4$ mit die niedrigsten Werte liefert. Bei TCA nimmt sowohl in der $NaHCO_3$- als auch in der $KHCO_3$-Reihe der scheinbare CoA-

Tab.27: Ergebnisse des Säureaufschlusses von Hefe in Abhängigkeit von der Kombination Säure/Neutralisationsmittel und von der Konzentration der Säure
(Test b4 aus Tab.5; externer Standard)

Säure	Neutralisations-mittel	lösliches CoA (nMol/g TG)	unlösliches CoA (nMol/g TG)
o,6 N $HClO_4$	$NaHCO_3$	16,7 ± 2,8 (2)	14,8 ± 3,4 (2)
o,2 N TCA	$NaHCO_3$	46,1 ±17,9 (2)	13,4 ± o,5 (2)
o,6 N TCA	$NaHCO_3$	26,o ± 1,3 (2)	1o,1 ± 1,7 (2)
1,o N TCA	$NaHCO_3$	23,7 ± 5,8 (2)	6,7 ± o,2 (2)
o,6 N $HClO_4$	$KHCO_3$	1o6,1 ±11,6 (2)	13,1 ± 4,5 (2)
o,2 N TCA	$KHCO_3$	64,2 ± 8,7 (2)	18,o ± o,5 (2)
o,6 N TCA	$KHCO_3$	38,2 ± 5,4 (2)	14,2 ± 1,5 (2)
1,o N TCA	$KHCO_3$	15,1 ± 1,7 (2)	13,6 ± 2,2 (2)

Gehalt mit steigender Molarität ab. Aus dem Vergleich der Paare $NaHCO_3$/o,6 N $HClO_4$ und $NaHCO_3$/o,6 N TCA folgt, daß $HClO_4$ bei gleicher Konzentration stärker als TCA hemmt (vgl.die entsprechende Beobachtung in 4.2.3.); aus dem Vergleich von $NaHCO_3$/o,6N TCA und $KHCO_3$/o,6 N TCA scheint außerdem zu folgen, daß Na^+ stärker als K^+ hemmt; dies sollte aber nach 2.3.4. nicht der Fall sein. Eine Erklärung könnte sein, daß die Konzentration an Na^+- und an K^+-Ionen in beiden Lösungen nach der Neutralisation nicht genau gleich war, da der pH-Wert lediglich mit Universalindicatorpapier eingestellt wurde.

Da in allen Fällen mit KOH verseift wurde, sind Abweichungen bei den Werten für unlösliches CoA allenfalls zufallsbedingt; sie sind in Tab.27 nur der Vollständigkeit halber angeführt. Für die Bestimmung von unlöslichem CoA ist eher die Kombination aus Lauge und zur Neutralisation der Verseifungsmischung verwendeter Säure von Bedeutung. Bei Aufschluß von Hefe mit der Kombination KOH/$HClO_4$ fanden wir 22,4 ± 1o,2 (3), mit NaOH/$HClO_4$ nur 15,6 ± 2,6 (3) nMol unlösliches CoA/g TG (externer Standard). Auch hier ist also die Wahl der Kombination K^+/ClO_4^- von Vorteil.

b) Eichung mit internem Standard

Bei Eichung mit internem Standard unter Beachtung der in 2.3.5. beschriebenen Grenzbedingungen erhält man für alle Kombinationen Säure/Neutralisationsmittel etwa die gleichen Ergebnisse (natürlich nur bei Verwendung ein und derselben Hefecharge), wie Tab.28 zeigt, in der nur ein Wert (unlösliches CoA beim Paar $NaHCO_3$/TCA) aus der Reihe fällt.

Tab.28: Ergebnisse des Säureaufschlusses einer FPP 1-Präparation in Abhängigkeit von der Kombination Säure/Neutralisationsmittel
(Test b4 aus Tab.5; interner Standard)

Säure	Neutralisationsmittel	lösliches CoA (nMol/g TG)	unlösliches CoA (nMol/g TG)
o,6 N $HClO_4$	$NaHCO_3$	-	16,5 ± o,1 (2)
o,6 N TCA	$NaHCO_3$	48,9 ± 6,o (3)	31,7 ± 6,5 (2)
o,6 N $HClO_4$	$KHCO_3$	54,9 ± 1,3 (2)	13,4 ± o,3 (2)
o,6 N TCA	$KHCO_3$	44,4 ±15,3 (4)	15,5 ± 3,1 (4)

4.3. Der Gehalt von CoA-Verbindungen in Leber und Hefe und seine Veränderungen

4.3.1. Der Gehalt von Leber an löslichem und unlöslichem CoA

a) Normalwerte in Schweine- und Rattenleber

In Tab.29 sind die in der Literatur angegebenen Gehaltswerte der Leber von gefütterten Ratten an löslichem und unlöslichem CoA zusammengestellt. Stamm und angewandte Testmethode sind ebenfalls in die Tabelle aufgenommen worden. Allgemein fällt auf, daß außer von (79) von keinem Autor sowohl der Gehalt an löslichem als auch an unlöslichem CoA angegeben wurde, sondern immer nur einer der beiden Werte. Alle Werte, besonders die Werte für lösliches CoA, schwanken sehr stark von Autor zu Autor, auch bei Tieren mit gleichem Ernährungszustand, in Abhängigkeit von dem jeweils angewandten Test und von der Aufschlußmethode. Die Werte

Tab.29: Gehalt der Leber von gefütterten Ratten an löslichem und unlöslichem CoA (Literaturwerte)
(alle Werte in nMol/g NG; Testbezeichnungen aus Tab.5)

Literatur	lösliches CoA	unlösliches CoA	Ratte	Test
(59)	418	-	-	b1
(17)	-	14,9 ± o,5 (3)	♀ Sprague-Dawley	b3
(48)	175	-	-	a4
(48)	126	-	-	a1
(48)	141	-	junges Tier	a4
(48)	7o	-	junges Tier	a1
(54)	47 ± 3,3 (5)	-	-	a2
(79)	385 ± 61 (7)	52,8 ± 8,6 (7)	♂ Whistar	a1
(135)	-	14,5 ± 2,6	-	
(49)	135 ± 8 (8)	-	-	a4
(136)	261	-	Sprague-Dawley	a4
(136)	156	-	Sprague-Dawley	b4
(95)	-	25,1 ± o,6 (5)	♂ Whistar	s.3.3.2.

Tab.3o: Gehalt von Ratten- und Schweineleber an löslichem und unlöslichem CoA, gemessen mit Test b4 aus Tab.5
(eigene Werte)

	lösliches CoA	unlösliches CoA	Eichung	
a) Rattenleber	97,o	19,8	extern	Exp.1
(♂ Whistar, nMol/g NG)	223,3	43,1	intern	Exp.1
b) Schweineleber	24o,9±15,3(4)	83,9±16,3(4)	extern	Exp.2
(Lyophilisat,	-	115,9	intern	Exp.2
nMol/g TG)	238,2±2o,5(4)	39,o± 4,4(4)	extern	Exp.3
	443,o	58,4	intern	Exp.3
	223,7±1o,3(6)	-	extern	Exp.4
	298,o± 4,7(2)	-	intern	Exp.4
	16o,6± 1,4(2)	5o,2± 4,2(2)	extern	Exp.5

für unlösliches CoA liegen nach (17) und (135) bei ca.15, nach (79) dagegen bei ca.5o nMol/g NG.

Tab.3o enthält die von uns gemessenen Werte für Ratten- und Schweineleber (bei letzterem das gefriergetrocknete Produkt), die mit Test b4 (Tab.5) bei Eichung mit externem und mit internem Standard erhalten wurden. Da aus den in 2.3.6. und 4.2.5. genannten Gründen die mit internem Standard erhaltenen Werte zuverlässiger sind, glauben wir sagen zu können, daß die höheren, von (79) angegebenen Werte richtiger sind, um so mehr, als sie mit einem stöchiometrischen Test bestimmt wurden, die von (17) und (135) angegebenen Werte dagegen mit einem kinetischen Test ohne zugesetzten internen Standard. Diese letzteren Werte stimmen daher sehr gut mit dem von uns bei Eichung mit externem Standard gemessenen, niedrigeren Wert überein.

Für Schweineleber fanden wir keine Literaturangaben; der Gehalt liegt im lyophilisierten Produkt nach unseren Messungen bei etwa 3oo bis 44o nMol löslichem und 6o bis 12o nMol unlöslichem CoA pro g Trockenmasse.

b) Veränderungen des Gehalts der Rattenleber beim Fasten

Auch über die Veränderungen des Spiegels an CoA-Verbindungen in der Rattenleber beim Fasten des Tieres bestehen in der Literatur Unklarheiten (s.Tab.31). Der Gehalt an löslichem CoA steigt nach (54) auf das 1,6-fache, während er nach (79) auf höherem Niveau konstant bleibt. Wir maßen sowohl mit externem als auch mit internem Standard einen Anstieg um den Faktor 1,6 bis 1,8, wobei wir mit internem Standard für den Hungerzustand den von (79) angegebenen höheren Wert bestätigen konnten.

Der physiologisch wesentlich wichtigere Spiegel an LCFA-CoA-Verbindungen (s.Kapitel 1.) steigt (in nMol/g Naßgewicht) nach (79) nur auf das 2,1-fache, nach (17) und nach (95) dagegen auf das 3,9- bzw. 3,6-fache. Wir bestimmten einen Faktor von 2,3 (externer Standard) bzw. 2,7 (interner Standard). Dabei stimmten die mit externem Standard berechneten relativen Werte ziemlich genau mit den ebenfalls extern geeichten Werten aus (17), die

Tab.31: Veränderungen des Gehalts von CoA-Verbindungen in der Rattenleber beim Fasten (eigene und Literaturwerte; alle Werte in nMol/g NG)

		lösliches CoA			unlösliches CoA		
	Eichung	gefüttert x_1	Fasten x_2	Faktor x_2/x_1	gefüttert y_1	Fasten y_2	Faktor y_2/y_1
(17)	-	-	-	-	14,9±o,5(3)	57,7±7,9(7)	3,87
(54)	-	47±3,3(5)	76±6,o(5)	1,62	-	-	-
(79)	-	385±61(7)	391±7o(8)	1,o2	52,8±8,6(7)	11o±28(8)	2,o8
(95)	-	-	-	-	25,1±o,6(5)	9o,1±4,2(6)	3,59
Exp.1	extern	97,o	171,8	1,77	19,8	45,8	2,31
Exp.1	intern	223,3	367,6	1,65	43,1	116,3	2,7o

Tab.32: Weitere Veränderungen beim Fasten von Ratten (eigene Werte mit ♂ Whistar)

	gefüttert	48 h Fasten	Faktor	Eichung
Körpergewicht (g)	275 ± 7(2)	2oo	o,73	-
Lebergewicht (g)	13,4 ± o,1(2)	7,2 ± o,4(2)	o,54	-
	1o,7 ± o,5(3)	5,6 ± o,5(3)	o,52	-
nMol lösliches CoA/ Leber	1o38	962	o,93	extern
	2389	2o59	o,86	intern
nMol unlösliches CoA/ Leber	212	257	1,21	extern
	461	651	1,41	intern

mit internem Standard berechneten absoluten Werte dagegen mit den Werten aus (79) überein. Die Gehaltswerte nach (95) liegen dazwischen.

Die von uns bestimmten Veränderungen des Körper- und des Lebergewichts während des 48-stündigen Fastens sowie der Gesamtgehalt der Leber an CoA-Verbindungen sind in Tab.32 dargestellt. Während das Körpergewicht etwa um ein Viertel abnimmt, reduziert sich

das Lebergewicht durch den starken Glycogenabbau um fast die Hälfte. Daher sind die Änderungen des Gesamtgehalts der Leber an CoA-Verbindungen kaum mehr signifikant. Bei Eichung mit internem Standard wurde für lösliches CoA sogar eine leichte Abnahme des Gesamtgehalts gemessen; für unlösliches CoA betrug der Faktor nur noch 1,4.

4.3.2. Normalwerte von löslichem und unlöslichem CoA in Hefe

In Tab.33 sind Literaturangaben zum Gehalt von Bäckerhefe an CoA-Verbindungen neben zahlreichen eigenen Bestimmungen angeführt, um einerseits die Fehlerbreiten von Säureaufschluß und kinetischem Test bei ein und derselben Hefecharge sowie andererseits die Schwankungen von einer Hefecharge zur anderen zu veranschaulichen. Auch hier lassen sich absolute Werte nur bei Eichung des kinetischen Tests mit internem Standard gewinnen (siehe die entsprechenden Werte in Tab.33 sowie Tab.28 und Abb.48). Im Gegensatz zu den Gehaltswerten in Leber bezogen wir bei Hefe meist auf 1 g Trockenmasse (außer bei den in 4.2.4. angeführten Wiederfindungsversuchen), um auch wäßrige Hefesuspensionen in die Untersuchungen einbeziehen zu können; bei frischer Hefe entspricht 1 g Naßgewicht etwa o,25 bis o,3 g Trockengewicht.

4.3.3. Veränderungen des Gehaltes von Hefe an CoA-Verbindungen bei Verarmung an Nahrungsstoffen

Die in 4.3.2. angegebenen Normalwerte der Hefe an löslichem und unlöslichem CoA lassen sich durch verschiedene Manipulationen verändern, so durch längeres Schütteln unter Sauerstoff bzw. Luft in einer wäßrigen Suspension, der verschiedene verwertbare Nährstoffe zugesetzt wurden (s.4.3.4.) oder ohne Zusätze (dieses Kapitel). In letzterem Fall verarmt die Hefe nach anfänglichem Verbrauch der endogen vorhandenen Nahrungsreserven sowie evtl. vom Züchtungsvorgang noch an der Zelloberfläche klebenden Nahrungsstoffe an oxidierbaren Substraten. Untersuchungen an verarmter Hefe - insbesondere der Umstand, daß diese im Gegensatz zu frischer Hefe erst nach einer längeren Induktionszeit in der Lage ist, Acetat zu veratmen, und daß diese Induktionszeit durch Zusatz kleinster Mengen dehydrierbarer Substrate verkürzt oder

Tab.33: Normalwerte für lösliches und unlösliches CoA in Hefe (Literaturwerte in nMol/g NG; Bezeichnungen für Testverfahren aus Tab.5; eigene Werte in nMol/g TG; Säureaufschluß von frischer Hefe mit der Kombination $HClO_4/KHCO_3$, Test b4 aus Tab.5, Eichung mit externem Standard, falls nichts anderes angegeben)

a) Literaturwerte:

Literatur	lösliches CoA	unlösliches CoA	Bemerkungen	Test
(59)	227 / 129	-	getrocknete Hefe	b1
(61)	491	-	getrocknete Hefe	b1
(48)	43	-	Kochsaft	a4
(48)	4o	-	Kochsaft	a1

b) eigene Werte:

	lösliches CoA	unlösliches CoA	Bemerkungen
Exp.1	87,7 ± 15,4(3)	9,1 ± 1,4(3)	-
Exp.2	58,o ± 13,3(3)	7,4 ± 2,8(3)	-
Exp.3	5o,2 ± 14,2(2)	19,8 ± 5,8(2)	-
Exp.4	8o,8 ± 3o,4(2)	9,3 ± 1,9(2)	-
Exp.5	56,2 ± 19,o(3)	22,4 ±1o,2(2)	-
Exp.6	79,3 ± 32,3(3)	19,1 ± 2,2(3)	-
Exp.7	49,9 ± 13,4(5)	11,4 ± 3,2(5)	-
Exp.8	46,1 ± 2,6(2)	1o,3 ± o,2(2)	-
Exp.9	44,5 ± 4,8(3)	1o,9 ± 2,5(3)	-
Exp.1o	48,1 ± 4,3(3)	13,3 ± 1,2(3)	-
Exp.11	43,3 ± 3,4(3)	13,3 ± 3,4(3)	-
Exp.12	56,4 ± 1,9(3)	1o,1 ± 2,o(3)	-
Exp.13	42,1 ± 2,3(3)	9,o ± 1,2(3)	-
Exp.14	52,9 ± 9,8(2)	8,3 ± 1,8(2)	-
Exp.15	76,2	16,8	-
Exp.16	68,2 ± 15,9(2)	13,8 ± o,5(2)	-
Exp.17	67,3	16,4	-
Exp.18	34,4	13,8	$TCA/KHCO_3$
Exp.19	69,5	2o,1	-
Exp.2o	68,5 ± 7,2(4)	19,4 ± 2,7(4)	-
Exp.21	115,7 ± 33,o(4)	31,2 ± 4,1(2)	interner Standard
Exp.22	1o5,1	41,2	FPP 1; interner Standard (s.Abb.48)

ganz aufgehoben werden kann - führten F.Lynen bereits 1942 zur Postulierung der "aktivierten Essigsäure" (137) und 1951 schließlich zu ihrer Identifizierung als Acetyl-CoA (61).

Nach (61) nimmt der Gehalt an löslichem CoA bei 24-stündiger Verarmung von Bäckerhefe von 479 ± 11o (3) auf 37o ± 7o (3) nMol/g getrocknete Hefe ab (umgerechnet mit der Äquivalenz: 1 Lipmann-Einheit ≙ 3,15 nMol CoA); der Faktor betrug o,78 ± o,o3(3). Die Gründe für die Abnahme des CoA-Gehalts sowie die zwischen CoA-Gehalt und Atmungsgröße bestehende Beziehung werden in (61) ausführlich diskutiert, so daß hier nicht näher darauf eingegangen werden soll. Auch bei Lagerung von Hefe - Lagerzeit und -temperatur sind nicht angegeben - wurde eine Abnahme auf das o,79-fache (von 6o5 auf 479 nMol/g getrocknete Hefe) beobachtet.

Die Abnahme des Gehalts der Hefe an löslichem CoA bei Verarmung konnten wir bestätigen (s.Abb.51). Nach 24 h bei 3o°C war der Gehalt von 58 auf 48 nMol/g TG gesunken (Faktor o,83), nach weiteren 24 h auf 32 nMol/g TG (Faktor für den 2.Tag o,67; Gesamtabnahme in 48 h auf das o,55-fache); d.h.die Abnahme hatte sich beschleunigt.

Außer einigen nicht veröffentlichten Versuchen von K.I.Arnstadt gab es bisher keine Angaben über die Veränderungen des Gehalts an LCFA-CoA-Verbindungen in Hefe während der Verarmung. Wie aus Abb.51 hervorgeht, bleibt der Gehalt an unlöslichem CoA zumindest innerhalb der ersten 48 h konstant (bei 9 bis 1o nMol/g TG); noch länger wollten wir nicht verarmen, weil wir ein teilweises Absterben der Hefezellen, verbunden mit Autolyse, befürchteten. Außerdem wurde noch ein Teil der gleichen Hefecharge aufgeschlossen, der 3 Tage bei 4°C gelagert worden war; ihr Gehalt an unlöslichem CoA betrug 1o,6 nMol/g Trockensubstanz, was praktisch dem Kontrollwert, gemessen an frischer Hefe, gleichkommt. Diese Ergebnisse stimmen im wesentlichen mit den von K.I.Arnstadt gefundenen überein (Arnstadt, persönliche Mitteilung).

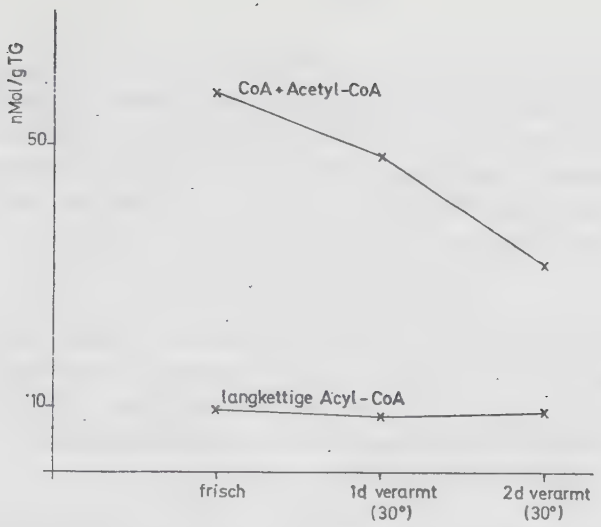


Abb.51: Die Veränderungen des CoA- und des LCFA-CoA-Gehaltes von Bäckerhefe bei der Verarmung

4.3.4. Veränderungen des Gehalts von Hefe an CoA-Verbindungen bei Inkubation mit verschiedenen Substraten

a) Inkubation der Hefe mit verschiedenen Substraten

Nicht nur durch die oben beschriebene Verarmung in destilliertem Wasser, sondern auch durch aerobe Inkubation in wäßrigen Lösungen verschiedener Substrate läßt sich der Gehalt der Hefe an CoA-Verbindungen beeinflussen. F.Lynen beschrieb bereits in der oben angegebenen Arbeit (61) den Einfluß von Acetat auf Atmungsgröße und CoA-Gehalt. Bei Verwendung von frischer Hefe soll der Gehalt an löslichem CoA schon innerhalb der ersten 15 min nach Zugabe des Acetats auf den Maximalgehalt von 1ooo bis 115o nMol/g getrockneter Hefe ansteigen; mit den in 4.3.3. angegebenen Werten für frische Hefe würde dies einem Anreicherungsfaktor von 1,7 bis 2,6 entsprechen. Verarmte Hefe benötigt dagegen mehrere Stunden, um auf diesen Wert zu kommen. Da wir nie sicher sein konnten, ob die gelieferte Hefe wirklich frisch war oder schon längere Lagerzeiten hinter sich hatte, bevorzugten wir daher längere Inkubationszeiten.

Die Beeinflussung des Gehalts an löslichem CoA war für uns nur ein Nebenprodukt unserer Untersuchungen; interessant war für uns hingegen, Substanzen herauszufinden, die die Hefe zur verstärkten Bildung von LCFA-CoA-Verbindungen veranlassen würden. Eine Anreicherung dieser Verbindungen war erwünscht, um für eine spätere Extraktion und Reinigung möglichst viel Material zur Verfügung zu haben.

Die Hefe wurde in wäßrigen Lösungen von Glucose, Glycerin, Kaliumacetat und Äthanol, letzteres in verschiedenen Konzentrationen, suspendiert und bei 3o°C mit Sauerstoff bzw. Luft durchströmt. Die Ergebnisse des Säureaufschlusses und der CoA-Bestimmungen sind in Tab.34 wiedergegeben:

Tab.34: Veränderungen des Gehalts an CoA-Verbindungen in Hefe bei Inkubation in verschiedenen Substraten (alle Werte in nMol/g TG; Test b4 aus Tab.5; externer Standard)

Gasraum	Substrat	Inkub.zeit	lsl.CoA	Faktor	unlsl.CoA	Faktor
-	- (Kontrolle)	-	31,7	1(def)	9,3	1(def)
O_2	1 % Äthanol (v/v)	5 h	43,8	1,38	17,3	1,86
Luft	1 % Äthanol (v/v)	11,5 h	67,1	2,12	35,9	3,86
Luft	1o% Äthanol (v/v)	6,5 h	-	-	1o,1	1,o9
Luft	1o% Äthanol (v/v)	14,5 h	78,7	2,48	3o,6	3,29
Luft	1o% Glucose (w/v)	3 h	67,8	2,14	28,9	3,11
Luft	1o% Glycerin (v/v)	15,5 h	2o,8	o,66	4,1	o,44
Luft	1o% K-Acetat (w/v)	3 h	54,2	1,71	18,7	2,o1

Der für lösliches CoA in Acetat gemessene Anreicherungsfaktor von 1,71 stimmt mit dem in (61) angegebenen überein. Die übrigen Faktoren für lösliches CoA seien hier nur der Vollständigkeit halber angeführt und sollen nicht näher diskutiert werden.

Die stärkste Anreicherung von LCFA-CoA-Verbindungen erfolgt nach Tab.34 bei aerober Inkubation in 1 % Äthanol (v/v); danach folgen 1o % Äthanol (v/v), 1o % Glucose- (w/v) und 1o % Kaliumacetat-Lösung. 1o % Glycerin (v/v) hat dagegen einen "Abreicherungs-

effekt", was wahrscheinlich auf das Abfangen von LCFA-CoA-Thiolestern durch Glycerin-1-phosphat bei der Glycerid- und Phospholipidbiosynthese zurückzuführen ist. Der Anreicherungseffekt von Äthanol könnte auf die Bereitstellung von Reduktionsäquivalenten für die Fettsäuresynthese zurückzuführen sein.

b) Anreicherung der Hefe in wäßrigem Äthanol

Unter "angereicherter Hefe" wird im folgenden Hefe verstanden, die infolge einer bestimmten Behandlungsweise einen höheren Gehalt an LCFA-CoA-Thiolestern als frische Hefe ohne Vorbehandlung aufweist. Die zu diesem erhöhten Gehalt führende Behandlungsweise - z.B.aerobe Inkubation mit einem bestimmten Substrat - wird entsprechend "Anreicherung" genannt.

Nachdem feststand, daß aerobe Inkubation in äthanolischer Lösung die Anreicherung besonders begünstigt, wurde versucht, die Bedingungen für maximale Anreicherung herauszufinden, indem die Äthanolkonzentrationen und die Inkubationszeiten unabhängig voneinander variiert wurden. Die Ergebnisse von drei Versuchsreihen sind in Tab.35 wiedergegeben. Es wurde jeweils unter Luftzufuhr bei 30°C inkubiert.

Bis auf die Inkubation mit 10 % Äthanol in Versuchsreihe 1, bei der ein Maximum auftrat, das sich in Versuchsreihe 3 nicht reproduzieren ließ, erhält man bei jeder Substratkonzentration für die Veränderungen des Gehalts an unlöslichem CoA mit der Inkubationszeit Sättigungskurven. Das bedeutet, daß bei einer Verlängerung der Inkubationszeiten über 12 h hinaus nur noch ein geringfügiger Anreicherungseffekt erwartet werden kann. Die Anreicherung gelang am besten in 1 % Äthanol, weniger gut in 5 % und am schlechtesten in 10 % Äthanol. Der Anreicherungseffekt war am größten, wenn in 1 % Äthanol 12 h lang inkubiert wurde.

Der Gehalt an löslichem CoA - in diesem Zusammenhang weniger bedeutsam - durchlief in Versuchsreihe 1 sowohl in 1 % als auch in 10 % Äthanol ein Maximum; in Versuchsreihe 2 und 3 wurden die entsprechenden Messungen allerdings nicht wiederholt.

Tab.35: Veränderungen des Gehalts an CoA-Verbindungen in Hefe bei Inkubation in wäßrigem Äthanol
(alle Werte in nMol/g TG; Test b4 aus Tab.5; externer Standard)

% Äthanol(v/v)	Inkubationszeit	lösl.CoA	Faktor	unlsl.CoA	Faktor
- (Kontrolle)	-	33,8	1(def)	9,4	1(def)
1o	3 h	5o,1	1,48	33,2	3,53
1o	6 h	125	3,7o	38,7	4,12
1o	9 h	72,5	2,14	22,2	2,36
1o	12 h	67,4	1,99	18,2	1,94
1	3 h	9o,7	2,68	27,3	2,9o
1	6 h	68,4	2,o2	48,8	5,19
1	12 h	79,7	2,36	54,4	5,79
- (Kontrolle)	-	-	-	13,9	1(def)
1	6 h	-	-	31,o	2,23
1	12 h	-	-	42,6	3,o6
- (Kontrolle)	-	-	-	1o,9	1(def)
5	6 h	-	-	27,9	2,56
5	12 h	-	-	36,9	3,39
1o	6 h	-	-	19,8	1,82
1o	12 h	-	-	29,3	2,69

Durch Vergleich der Werte aus Tab.35 sowie vieler weiterer hier nicht angeführter Einzelwerte - hauptsächlich für 6 oder 12 h Inkubation in 1 % Äthanol (v/v) - zeigt sich, daß trotz gleicher Anreicherungsmethodik bei verschiedenen Hefechargen verschieden stark angereichert wird: Der Anreicherungsfaktor schwankt zwischen 2 und 6. Dies ist offensichtlich auf die Tatsache zurückzuführen, daß wegen wechselnder Lieferungs- und Lagerbedingungen nicht immer von Hefe in genau dem gleichen Zustand ausgegangen werden konnte (vgl. hierzu auch Tab.33). Dieser Fehler könnte wahrscheinlich nur durch Züchtung eines einheitlichen Hefestamms und Erntung immer in derselben, z.B.in der logarithmischen Wachstumsphase, behoben werden. Entsprechende Versuche wurden zwar begonnen - u.a.wurde aus Bäckerhefe ein einheitlicher Stamm von Saccharomyces cerevisiae auf Schrägagar isoliert - wegen des zu erwartenden hohen Zeitaufwandes jedoch schließlich nicht weiter verfolgt.

4.3.5. Weitere Messungen im Zusammenhang mit der Inkubation von Hefe in wäßrigem Äthanol

a) Abnahme der Äthanolkonzentration während der Anreicherung

In 4.3.4. wurde gefunden, daß es für eine maximale Anreicherung am günstigsten ist, wenn die Hefe 12 h lang in 1 % Äthanol (v/v) bei 3o°C belüftet wird. Dabei besteht allerdings die Gefahr, daß so viel Äthanol von der Hefe veratmet oder durch den Luftstrom fortgeblasen wird, daß am Ende der Inkubationszeit kein Substrat mehr vorhanden ist. Es war also von Interesse, die Veränderungen des Äthanolgehalts der Inkubationslösung in Abhängigkeit von der Inkubationszeit zu messen. Zu definierten Zeiten wurden daher aus der Inkubationslösung Aliquote entnommen, verdünnt und die Äthanolkonzentration mit der im experimentellen Teil beschriebenen Endwertmethode mit Alkohol-Dehydrogenase bestimmt. Die mit diesem optischen Test erhaltenen Werte sind in Abb.52 graphisch dargestellt. Aus der Extrapolation der abgebildeten Kurve ergibt sich, daß auch noch nach 12 h Substrat vorhanden sein muß, und zwar etwa 15 bis 2o % der Ausgangsmenge.

Beim Versuch zu Abb.52 waren im Gesamt-Flüssigkeitsvolumen von 6oo ml 12 g Hefe-Frischgewicht enthalten; d.h. die Konzentration betrug 2o mg/ml. Die Äthanolkonzentration war zu Beginn 7,99 mg/ml oder - mit dem Molekulargewicht 46 für Äthanol - 174 µMol/ml. In 4.3.5.b) werden die Atmungsrate von Hefe in äthanolischer Lösung zu o,67 µMol O_2/h/mg Frischgewicht und das Molverhältnis O_2/Äthanol zu 1,7 bestimmt. Daraus folgt, daß in 12 h von 1 ml der obigen Suspension (o,67 x 12 x 2o)/1,7 = 94,6 µMol Äthanol verbraucht werden, also etwa 54 % der Gesamtmenge. In einem Kontrollexperiment ohne Hefe wurden bereits nach 5 h ca. 5o % des Äthanols allein durch den Luftstrom verblasen, so daß bei dem Versuch zu Abb.52 nach 12 h eigentlich kein Äthanol mehr in der Lösung enthalten sein dürfte. Daß trotzdem am Ende noch 15 bis 2o % der Anfangskonzentration an Äthanol vorhanden sind, könnte damit erklärt werden, daß die Hefezellen Äthanol als einziges zur Verfügung stehendes Substrat rasch in sich aufnehmen und ihren Vorrat erst dann allmählich verbrauchen; der Gehalt der Lösung an Äthanol würde also zu Beginn überproportional schnell gesenkt, so daß nicht mehr soviel Äthanol abgesaugt werden könnte. Tatsächlich zeigt die Kurve in Abb.52 einen derartigen Verlauf.

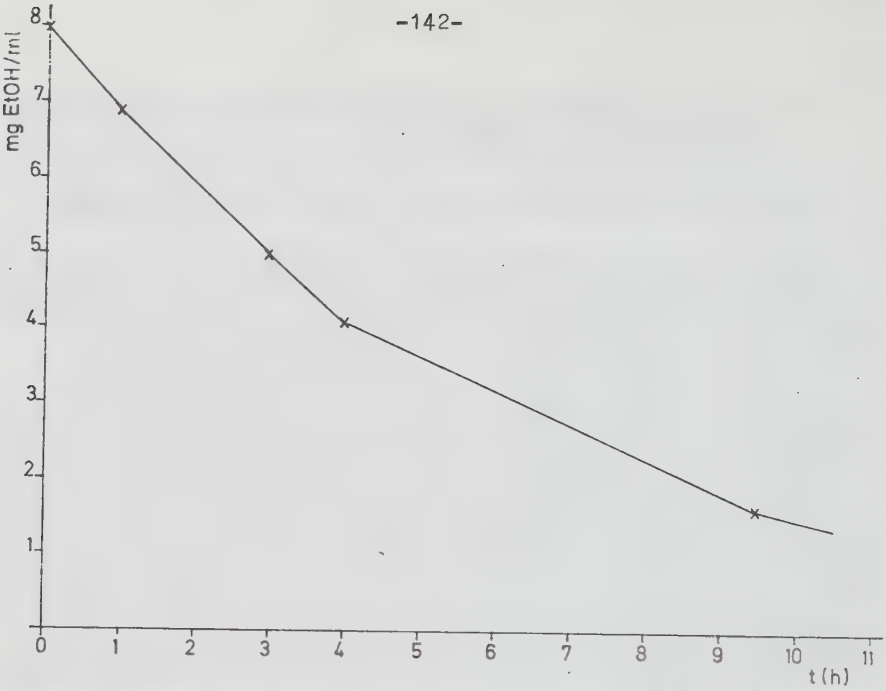


Abb.52: Veränderungen des Äthanolgehaltes einer 1 % (v/v) Äthanol-Lösung, enthaltend 12 g Hefe/600 ml, bei Durchsaugen von Luft bei 30°C

b) Die Atemgröße der Hefe in äthanolischer Lösung und das O_2/Äthanol-Molverhältnis

Die Atemgröße der Hefe in äthanolischer Lösung und das O_2/Äthanol-Molverhältnis wurden manometrisch nach (138) gemessen (s.6.4.4.).

Die Atemgröße oder der O_2-Verbrauch der Hefe, bezogen auf 1 mg Frischgewicht und 1 h, kann aus der Druckänderung bei konstantem Volumen und konstanter Temperatur bestimmt werden, wenn das bei der Atmung gebildete CO_2 gleichzeitig durch Alkali quantitativ absorbiert wird. Zur Messung der Atemgröße wurde wie bei der oben beschriebenen Anreicherung 1 % Äthanollösung (v/v) gewählt, d.h.das Substrat lag in großem Überschuß vor. Der gemessene Gesamt-O_2-Verbrauch zweier Hefesuspensionen, deren Konzentrationen an Hefe sich wie 1 : 2 verhielten, ist in Abb.53 gegen die Versuchszeit aufgetragen. Es ergeben sich zwei Geraden, deren Steigungen sich wie 526 : 974,6 = 1,08 : 2 verhalten; das entspricht ungefähr dem Verhältnis 1 : 2 der Hefekonzentrationen. Die Sauer-

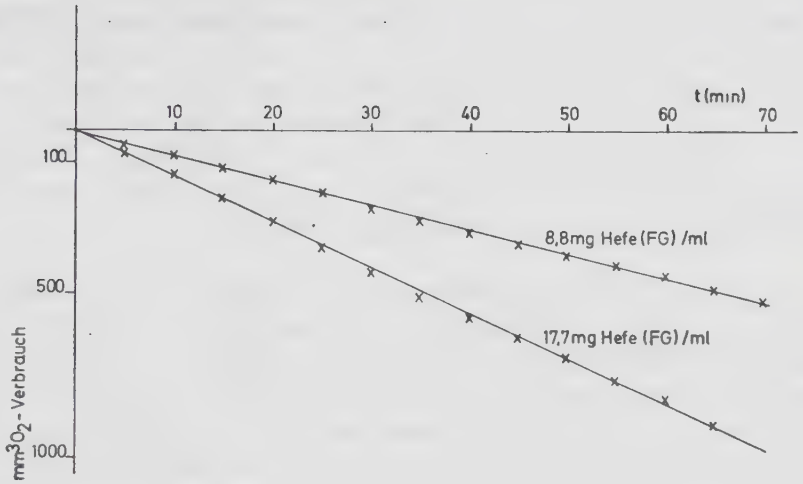


Abb.53: O_2-Verbrauch (manometrisch gemessen) zweier Hefesuspensionen in 1 % (v/v) Äthanollösung bei 3o°C
Volumen des Warburggefäßes: 3,4 ml

stoffsättigungskonzentration ist also auch für die höhere Hefekonzentration noch ausreichend, so daß die für die beiden Hefesuspensionen errechneten Atemgrößen nicht wesentlich voneinander abweichen.

Für die verdünntere Hefesuspension errechnet sich die Atemgröße wie folgt:
In einem Warburggefäß sind 1o mg/ml x 3 ml = 3o mg Hefe-Frischgewicht enthalten. Der O_2-Verbrauch pro h beträgt 448,1 mm^3, das sind 448,1/22,4 = 2o µMol, da 1 µMol O_2 bei o°C und 76o mm Hg das Volumen 22,4 mm^3 einnimmt. Daraus folgt für die Atemgröße: 1 mg Hefe-Frischgewicht verbraucht in 1 % Äthanollösung (v/v) bei 3o°C 15,o mm^3 oder o,67 µMol Sauerstoff pro Stunde.

Zum Vergleich berechneten wir aus den in (61) gemachten Angaben die Atemgröße für eine 16,7 mM Natriumacetat-Lösung (enthaltend 13,3 mg Hefe-Frischgewicht/ml). Sie beträgt 13,1 mm^3 O_2 pro mg und h; dies stimmt etwa mit der von uns in 1 % Äthanol gemessenen Atemgröße überein.

Aus den Meßwerten für die Kontrollgefäße, die nur Hefesuspensionen ohne Äthanol enthielten, konnte außerdem noch entnommen werden, daß die "Nullatmung" der Hefe, d.h.die Atmung ohne zugesetztes Substrat, zu Beginn 2o bis 3o % der Substratatmung ausmacht, was wohl auf die Veratmung anhaftender Nährstoffreste aus der Fabrikzüchtung zurückzuführen ist; nach etwa 2o min fällt sie jedoch auf einen kleinen konstanten Wert ab, der von der Veratmung zelleigener Speicherstoffe herrührt.

Um das O_2/Äthanol-Molverhältnis bestimmen zu können, müssen kleine limitierende Mengen Äthanol eingesetzt werden, die in angemessener Zeit von der Hefe vollständig verbraucht werden können. Wenn sich der Gesamt-Sauerstoffverbrauch dann nach einer gewissen Zeit nicht mehr ändert, kann angenommen werden, daß das Substrat Äthanol vollständig verbraucht worden ist und aufgrund dieser Annahme der Quotient O_2/Äthanol berechnet werden. Für die Äthanolmengen 2, 5 und 1o µMol pro Warburggefäß ist der Gesamt-O_2-Verbrauch von 3o mg Hefe bei 3o°C in Abb.54 gegen die Versuchszeit aufgetragen. Man erhält drei Sättigungskurven, deren Anfangstangenten untereinander und mit der in Abb.53 dargestellten Geraden für die gleiche Hefekonzentration (8,8 mg/ml) zusammenfallen, obwohl die entsprechenden Äthanolmengen stark voneinander abweichen: sie betragen 2, 5, 1o und 592 µMol pro Gefäß. Man kann also sagen, daß die Äthanolkonzentration für die Atmungsrate völlig belanglos ist, solange überhaupt noch Substrat vorhanden ist.

Die Endwerte für den gesamten Sauerstoffverbrauch verhalten sich wie 375,7 : 185,9 : 79,5 = 1o : 4,95 : 2,12; das entspricht ziemlich gut dem Verhältnis der einpipettierten Äthanolmengen 1o : 5 : 2. Die Molverhältnisse O_2/Äthanol sind:

bei 1o µMol Äthanol: 375,7/(22,4 x 1o) = 1,68
bei 5 µMol Äthanol: 185,9/(22,4 x 5) = 1,66
bei 2 µMol Äthanol: 79,5/(22,4 x 2) = 1,77

Das arithmetische Mittel beträgt 1,7o $\pm$ o,o6 (3) Mol O_2 pro Mol Äthanol. Bei vollständiger Oxidation des Äthanols nach der Gleichung:

(XXVII) $C_2H_5OH + 3\ O_2 = 2\ CO_2 + 3\ H_2O$

müßte das Molverhältnis O_2/Äthanol 3,o betragen. Die Hefezelle

oxidiert also nur etwa 57 % des zur Verfügung stehenden Äthanols zu Kohlendioxid und Wasser; der Rest wird in zelleigene Bestandteile übergeführt.

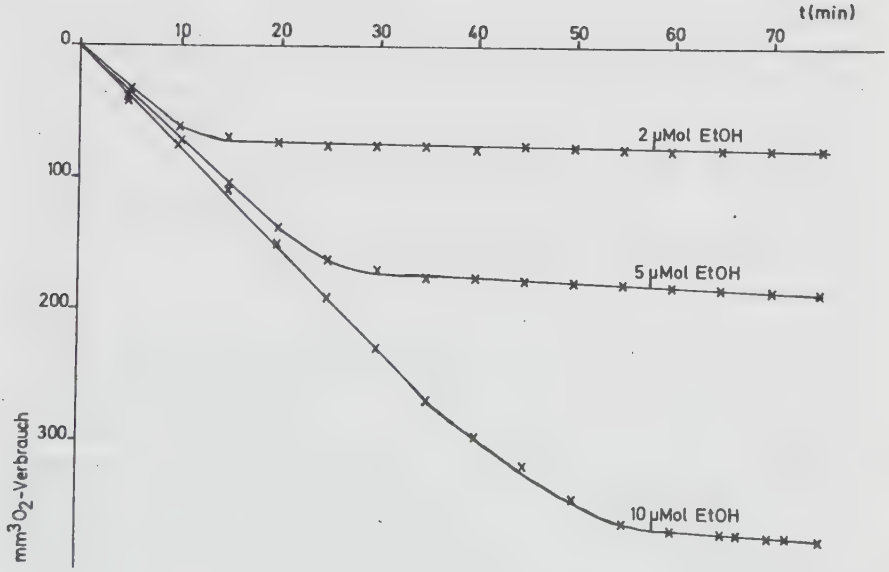


Abb.54: O_2-Verbrauch (manometrisch gemessen) von 3o mg NG Hefe bei 3o°C für wechselnde Äthanolkonzentrationen

5. Extraktion, Reinigung und Charakterisierung der LCFA-CoA-Verbindungen aus biologischem Material

5.1. Extraktion der LCFA-CoA-Verbindungen aus biologischem Material

5.1.1. Einleitung

In Kapitel 5. soll die Extraktion der LCFA-CoA-Verbindungen aus biologischem Material, die Entfernung von Verunreinigungen (Protein und Lipid) aus diesen Extrakten sowie schließlich die Isolierung und Charakterisierung der reinen LCFA-CoA-Fraktion beschrieben werden. Wegen der bereits in 3.1.2.d) angeführten Ähnlichkeiten zwischen LCFA-CoAs und polaren Lipiden, die u.a. zur Folge haben, daß in Lipidextrakten meist auch LCFA-CoAs zu finden sind, lassen sich die für Lipidextraktion und Reinigung von Lipidextrakten in der Literatur angeführten Methoden zum Teil auf das hier vorliegende Problem anwenden.

Biologisches Material soll nach (127) zum Zweck der Lipidextraktion möglichst sofort aufgearbeitet werden oder zumindest in Trockeneis oder flüssigem Stickstoff eingefroren und dann bis zur weiteren Aufarbeitung bei -2o°C aufbewahrt werden. Die Extraktion selbst soll dagegen vorzugsweise bei Raumtemperatur erfolgen, da sich bei niedrigerer Temperatur das Lipid schlechter löst und bei höherer Temperatur evtl. Lipasen und Phospholipasen aktiviert werden können. Kontaminationen müssen natürlich ausgeschlossen werden (Verwendung von nichtgefetteten Glasstopfen, Teflonstopfen und -hähnen, Siliconfett).

Zur Geringhaltung oder Vermeidung von Autoxidation der Lipide mit mehrfach ungesättigten Fettsäureresten werden von verschiedenen Autoren empfohlen:

Vermeidung direkter starker Belichtung,

Ausschluß von Luftsauerstoff durch Arbeiten unter N_2,

völlige Reinigung und Entgasung der verwendeten Lösungsmittel,

Zusatz des Antiautoxidans 2,6-Di-t-butyl-p-Kresol (BHT),

Vermeidung des Einengens zur völligen Trockene (zur Trockengewichtsbestimmung soll immer nur ein Aliquot völlig getrocknet werden)

Verwendung von polaren Lösungsmitteln, die nicht nur die Autoxidation verzögern, sondern auch die Wirkung abbauender Enzyme hemmen.
Wegen der Bildung von Peroxiden sollte Diäthyläther, wenn möglich, nicht verwendet werden, u.a. auch wegen der in 3.5.3. erwähnten "Geistergipfel" (ghost peaks) in Gaschromatogrammen.

Für die von uns durchgeführten LCFA-CoA-Extraktionen ist die Autoxidationsgefahr als unbedeutend zu veranschlagen, da wegen des polareren Charakters dieser Verbindungen sowieso polare Lösungsmittel zur Verwendung kamen, außerdem nur völlig reine Lösungsmittel eingesetzt wurden und durch Abziehen des Lösungsmittels unter vermindertem Druck und bei niedriger Temperatur (am Rotationsverdampfer oder Gefriertrockner) die Wirkung von Luftsauerstoff gering gehalten wurde.

Neutrallipide sind bereits mit unpolaren Lösungsmitteln wie Petroläther leicht extrahierbar. Dagegen liegen polare Lipide (Phospholipide, Glycolipide, Steroide) meist als Protein-Lipid-Komplex vor, sind also nicht-kovalent mit Protein verbunden, so daß die Verwendung dehydratisierender Lösungsmittel wie Äthanol oder Methanol notwendig wird; nach der Extraktion muß das unlösliche denaturierte Protein dann durch Filtration oder Zentrifugation entfernt werden. Das meist angewandte Lipidextraktionsmittel ist Chloroform:Methanol = 2:1; von den häufigeren polaren Lipiden werden damit nur Polyphosphoinosite nicht vollständig extrahiert. Pflanzengewebe machen wegen der Anwesenheit sehr aktiver Phospholipasen Schwierigkeiten; sie werden zweckmäßig nach Homogenisieren in Isopropanol mit Chloroform:Isopropanol = = 2:1 extrahiert, da Isopropanol Phospholipasen desaktiviert.

Es ist keine selektive Extraktionsmethode für polare Lipide bekannt; man kann lediglich einen Gesamtlipidextrakt erzeugen, der dann weiter in Neutrallipide und polare Lipide fraktioniert werden kann (s.Kapitel 5.2.). Entsprechend lassen sich auch LCFA-CoAs aus biologischem Material nicht extrahieren, ohne daß Lipide, aber auch Proteine und andere Verunreinigungen mitextrahiert werden. In Kapitel 5.1. soll daher zunächst das Extraktionsverhalten von LCFA-CoA-Verbindungen sowie verschiedenen Verunreinigungen untersucht werden, während sich Kapitel 5.2. mit der Reinigung der erhaltenen Extrakte beschäftigt.

5.1.2. Extraktion von LCFA-CoA-Verbindungen

Wir gingen bei den Extraktionen so vor, daß wir das jeweilige Material auf verschiedene Art und Weise (s.6.5.) mit dem betreffenden Extraktionsmittel homogenisierten, das Homogenat zentrifugierten, den Extrakt oder ein Aliquot davon zur Trockene brachten (am Rotationsverdampfer oder Gefriertrockner) und ihn in dieser Form gemäß der Vorschrift für den Säureaufschluß weiterbehandelten; evtl. zur Kontrolle auch noch den Extraktionsrückstand.

Im Hinblick auf die weitere Aufbereitung für den CoA-Test sind grundsätzlich zwei Typen von Extraktionen zu unterscheiden:
Entweder wird das lösliche CoA schon zuvor mit Hilfe des Säureaufschlusses abgetrennt und nur der gewaschene $HClO_4$-Niederschlag extrahiert, so daß sowohl der Extrakt als auch der Extraktionsrückstand nur unlösliches CoA enthalten und gleich mit der Verseifung fortgefahren werden kann (Typ I),
oder die Hefe wird direkt extrahiert, so daß man bei unmittelbar anschließender Verseifung von Extrakt und Rückstand nur das extrahierte und nicht-extrahierte Gesamt-CoA mißt (Typ II); werden sowohl eingeengter Extrakt als auch der Rückstand dem Säureaufschluß unterworfen, so kann man jedoch nicht nur das extrahierte und nichtextrahierte unlösliche CoA, sondern auch extrahiertes und nichtextrahiertes lösliches CoA messen, was mit Typ I nicht möglich ist.

Wir führten umfangreiche Untersuchungen durch, in denen wir Extraktionsmittel, Volumen, Art und Dauer der Extraktion sowie Temperatur variierten. Die verwendeten Lösungsmittelgemische und Extraktionsprozeduren sowie die mit dem kinetischen Test erhaltenen Ergebnisse sind im experimentellen Teil zusammengestellt (s.6.5.).

Die pyridinhaltigen Extraktionsmittel, insbesondere E2 (Pyridin:Isopropanol:Wasser = 1:1:2), erwiesen sich für alle angewandten Extraktionsprozeduren als relativ am besten, während Äthanol-HCl-Mischungen und die vornehmlich für die Extraktion von Lipiden angewandten Chloroform-Methanol-Mischungen verhältnismäßig schlecht abschnitten.

Eine Kontrolle der Vollständigkeit der Extraktion kann auch durch Säureaufschluß des Rückstands erfolgen; die Bilanzsumme (aus Rückstand und Extrakt) muß bei mehrmaliger Extraktion annähernd konstant und gleich dem "Ausgangswert", d.h.dem Gehalt in nichtextrahiertem Material sein. Diese Erwartung wurde durch die Versuchsergebnisse gut erfüllt.

Wir verfolgten die Extraktion von LCFA-CoA-Verbindungen außer mit Hilfe des kinetischen Tests auch durch Zugabe von 1-^{14}C-PCoA und Radioaktivitätsmessung in den Extrakten. Die Ergebnisse dieser Versuchsreihen sind ebenfalls im experimentellen Teil zu finden (s.6.5.).

5.1.3. Mitextraktion von Verunreinigungen, insbesondere von Lipiden

In den LCFA-CoA-enthaltenden Extrakten sind naturgemäß viele Verunreinigungen enthalten, insbesondere Lipide, in E2-Extrakten (besonders aus Leber) aber auch reversibel denaturierbare Proteine. Wir untersuchten in zahlreichen Versuchsreihen die Mitextraktion von Gesamt-Trockenmasse, Protein, anorganischem und Gesamt-Phosphat sowie Lipiden. Als Marker für die Extraktion von Neutrallipiden setzten wir 1-^{14}C-Palmitinsäure ein (s.6.5.).

Da, wie bereits in 5.1.1. erwähnt, mit jeder Extraktion von LCFA-CoA-Verbindungen aus biologischem Material unvermeidlicherweise auch Lipide, besonders Phospholipide, extrahiert werden und allein die Phospholipide bereits um den Faktor 10^3 stärker vertreten sind als die LCFA-CoAs (s.6.5.), so daß nicht nur wegen der chemischen Ähnlichkeit, sondern allein schon von den zugrundeliegenden Mengenverhältnissen her Schwierigkeiten bei der quantitativen Abtrennung erwartet werden müssen, ist es erforderlich, sich mit der Zusammensetzung, Extraktion und Analyse des Lipidanteils zu befassen. Angaben über Lipidzusammensetzungen und eindimensionale Dünnschichtchromatographie von Lipiden sind im experimentellen Teil enthalten (Kapitel 6.5.).

a) Auffindung von LCFA-CoAs in Lipidextrakten

Zur Auffindung der nur in Spuren vorkommenden LCFA-CoAs in Lipidextrakten verwendeten wir zweidimensionale Dünnschichtchro-

matographie (wegen der Schnelligkeit und besseren Auflösung meist auf HPTLC-Platten mit Fluoreszenzindicator) mit den nacheinander und in vertikal zueinander stehenden Laufrichtungen anzuwendenden Laufmittelkombinationen B/C, B/E oder E/C. Ist LCFA-CoA vorhanden, so muß bei den Kombinationen B/C und B/E ein fluoreszenzlöschender Fleck in der Mitte der C- bzw. E-Linie erscheinen (s.Abb.55); bei Kombination E/C in der Nähe des Mittelpunkts der HPTLC-Platte. Wenn vor der Entwicklung zusätzlich 1-^{14}C-PCoA aufgetragen wird, darf natürlich kein zusätzlicher fluoreszenzlöschender Fleck entstehen; die Radioaktivität muß im selben Fleck erscheinen (Lokalisierung mit Hilfe des Dünnschichtscanners).

Das bei zweidimensionaler Dünnschichtchromatographie verschiedener Lipide im System B/E erhaltene Muster ist in Abb.55 dargestellt und mit einem in (117) angegebenen Schema verglichen. Wie sich aus dieser Gegenüberstellung sowie aus weiteren in der Literatur gemachten Angaben ergibt, ist das Fleckenmuster in der zweidimensionalen Dünnschichtchromatographie nicht völlig reproduzierbar; besonders die Art des applizierten Lösungsmittels, das Mengenverhältnis der Lipidbestandteile sowie die Vorbehandlung der Platte mit Dampf von Laufmittel B können das Muster verändern und die Identifizierung einzelner Komponenten wesentlich erschweren. Die Identifizierung von LCFA-CoAs mit dem System B/E ist dagegen, sofern keine Ganglioside vorhanden sind (diese kommen in Hefe ohnehin nicht vor), recht eindeutig, da LCFA-CoAs im Gegensatz zu den meisten Phospholipiden in Laufmittel B am Start bleiben und daher zumindest in diesem Laufmittel keine Rf-Wertverschiebungen stattfinden können.

b) Lipide als Begleitstoffe

In 6.5. wird gezeigt, daß zumindest bei direkter Extraktion von Hefe oder FPP mit E2 neben LCFA-CoAs beträchtliche Mengen FFA mitextrahiert werden (bei Extraktion der entsprechenden $HClO_4$-Niederschläge allerdings wesentlich weniger). Ebenfalls nach 6.5. werden auch größere Mengen Gesamtphosphat mitextrahiert. Daraus und aus dem in 5.1.1. Gesagten läßt sich schließen, daß im E2-Extrakt auch andere Lipide, besonders Phospholipide und andere polare Lipide, enthalten sein müssen. Wir untersuchten daher den Lipidgehalt von Hefe-E2-Extrakten mit eindimensionaler Dünnschicht-

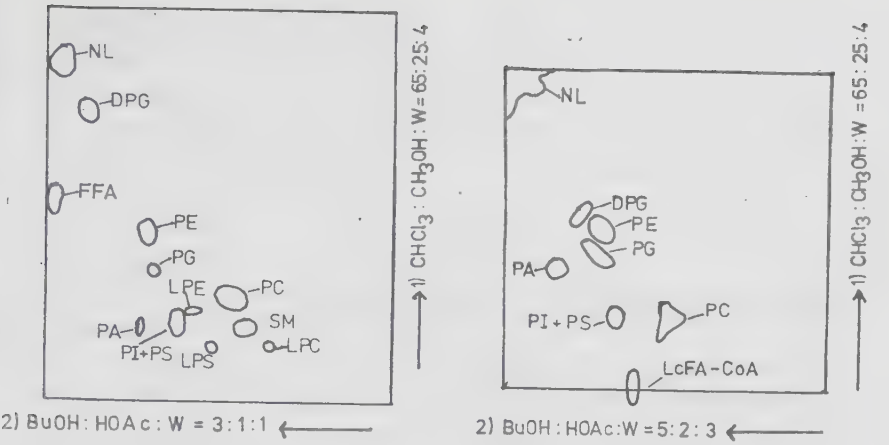


Abb.55: Zweidimensionale Dünnschichtchromatographie von Lipiden (Laufmittelsystem B/E)
links: nach (117), verändert
rechts: eigene Werte (HPTLC; einschließlich LCFA-CoA)

chromatographie in Laufmittel A (für Neutrallipide) und B (für Phospholipide) und verglichen auch mit einem Gesamtlipidextrakt, der mit Chloroform:Methanol = 2:1 erhalten wurde, sowie mit Aceton- und Butanol:Eisessig:Wasser = 5:2:3 -Extrakt.

Chloroform-Methanol und Butanol-Eisessig-Wasser extrahierten so gut wie alle laut Literaturangaben in Hefe zu erwartenden Neutral- und Phospholipide (außerdem noch mehrere nichtidentifizierte Komponenten). E2 extrahierte zwar - bis auf zwei Komponenten - die gleichen Phospholipide (darunter PI, PS, PC), aber nur drei Neutrallipidkomponenten; davon ist eine FFA, wie bereits bekannt; Triglyceride und andere völlig unpolare Lipide werden anscheinend nicht extrahiert. Aceton schließlich extrahiert nur zwei Phospholipidkomponenten, aber alle Neutrallipide.

5.2. Reinigung der LCFA-CoA-Verbindungen aus Extrakten

In diesem Kapitel soll die Isolierung der LCFA-CoA-Fraktion durch Reinigung der in 5.1. gewonnenen Extrakte behandelt werden; dabei können die bei der Reinigung der LCFA-CoA-Verbindungen aus

synthetischen Ansätzen gewonnenen Erfahrungen (s.3.4.) mit verwendet werden. Wegen der größeren Vielfalt der Verunreinigungen in Extrakten aus biologischem Material treten allerdings einige neue Aspekte hinzu. Die Einteilung der Reinigungsmethoden erfolgt wieder nach dem in 3.4. angegebenen Schema in Fällungs- und Ausschüttelverfahren (allgemeiner Fest-Flüssig-Verteilung, s.5.2.1. und Flüssig-Flüssig-Verteilung, s.5.2.2.) sowie chromatographische Methoden (5.2.3.).

5.2.1. Reinigung durch Fest-Flüssig-Verteilung

Da alle Neutrallipide in Petroläther, Äther und Chloroform löslich sind, können sie relativ leicht von den übrigen Lipiden abgetrennt werden. Obwohl es keine selektive Extraktionsmethode für polare Lipide gibt, so können sie doch auf Grund ihrer unterschiedlichen Löslichkeiten partiell fraktioniert werden. Im allgemeinen wird angenommen, daß Phospholipide und Glykolipide durch Aceton ausgefällt werden können, daß SM in Äther und Pyridin unlöslich ist und daß PC in Äthanol löslich, die Kephaline PE, PS und PI dagegen unlöslich sind. Manchmal lassen sich diese Löslichkeitsunterschiede tatsächlich zur präparativen Trennung von polaren Lipiden ausnutzen: Da z.B. in Eigelb PC und PE praktisch als einzige Phospholipide vorkommen, kann man durch Fällung mit Äthanol relativ reines PE gewinnen. Bei den meist vorkommenden komplexen Gemischen gibt es jedoch wegen gegenseitiger Solubilisierung der polaren Lipide Schwierigkeiten mit der fraktionierten Fällung. Zudem lassen sich die empirisch ermittelten Löslichkeitsunterschiede nicht verallgemeinern: So ist synthetisches PE in Äthanol mäßig, Dioleyl-PE sogar gut löslich. Manche synthetischen PC-Spezies lösen sich sogar in Aceton.

Wegen der Ähnlichkeiten zwischen Phospholipiden und LCFA-CoAs sind ähnliche Schwierigkeiten bei deren Trennung durch Fest-Flüssig-Verteilung zu erwarten. Ein Teil der Lipidverunreinigungen konnte jedoch von uns bereits vor der Extraktion der LCFA-CoAs abgetrennt werden, indem wir die unterschiedlichen Lösungseigenschaften bestimmter Extraktionsmittel für LCFA-CoAs einerseits und FFA andererseits ausnutzten. Wie in 6.5. mehrfach gezeigt, extrahieren unpolare Lösungsmittel wie Petroläther, Aceton, Toluol, in weniger spezifischer Weise auch Chloroform:Methanol = 2:1 und

Äther, fast ausschließlich FFA und andere Neutrallipide (fast keine LCFA-CoAs), während typische LCFA-CoA-Lösungsmittel wie E2 auch FFA extrahieren (allerdings nicht alle anderen Neutrallipide). Für $HClO_4$-Niederschläge ist wegen der mangelnden Benetzung durch Petroläther und Toluol nur Aceton als spezifisches FFA-Extraktionsmittel brauchbar.

Extrahiert man also biologisches Material oder einen $HClO_4$-Niederschlag davon zunächst ein oder mehrere Male mit Aceton, so werden FFA und Neutrallipide spezifisch extrahiert (außerdem noch einige Phospholipide); durch eindimensionale HPTLC in Laufmittel A kann die Vollständigkeit dieser Extraktion kontrolliert werden. Extrahiert man den Aceton-Rückstand anschließend mit E2, so werden LCFA-CoAs und die restlichen Phospholipide extrahiert; man erhält also einen vorgereinigten LCFA-CoA-Extrakt, aus dem ein Großteil der Lipide bereits entfernt ist. Die Vollständigkeit der E2-Extraktion kann durch HPTLC in Laufmittel B verfolgt werden; wenn keine Phospholipidflecke mehr auftauchen, ist auch LCFA-CoA mit großer Wahrscheinlichkeit vollständig extrahiert.

Eine weitere Kontrolle erhält man durch Zugabe von radioaktiven Markern: Abb.56 zeigt die differentielle Extraktion von rohem, also nicht von überschüssiger 1-^{14}C-Palmitinsäure gereinigtem 1-^{14}C-PCoA aus FPP 3 mit der Kombination Aceton/E2. Der Extraktionsverlauf mit Aceton besitzt die Form einer Sättigungskurve; die mit jedem Schritt extrahierte Radioaktivität erreicht nach 4 bis 5 Extraktionen einen kleinen konstanten Wert, aber wird nicht gleich Null, da Aceton auch ein geringes Lösungsvermögen für PCoA besitzt. Extrahiert man weiter mit E2, so wird plötzlich wieder sehr viel Radioaktivität extrahiert; auch der Verlauf der Extraktion mit E2 strebt einer Sättigung entgegen.

In Tab.36 sind einige weitere differentielle Extraktionen dargestellt. Bei differentieller Extraktion von $HClO_4$-Niederschlägen erhält man mit Aceton etwa den gleichen Extraktionsverlauf wie in Abb.56; die anschließende E2-Extraktion geht aber wesentlich schleppender vor sich. Nach 6 E2-Extraktionen von Schweineleber-Lyophilisat-$HClO_4$-Niederschlag sind beispielsweise erst $\frac{(66,3-51,7)}{(100-51,7)} \times 100 = 30,2$ % des 1-^{14}C-PCoA (genauer: der noch nicht durch Aceton extrahierten Radioaktivität) extrahiert.

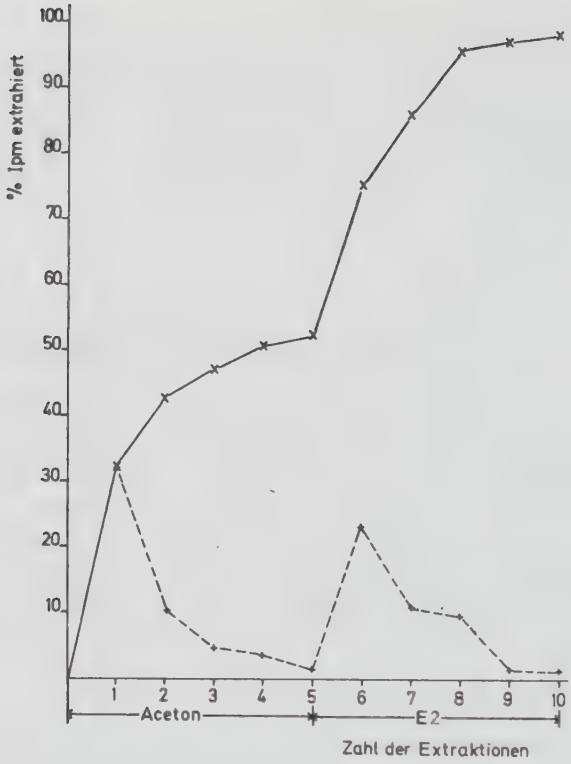


Abb.56: Differentielle Extraktion von 1-^{14}C-Palmitinsäure und 1-^{14}C-PCoA aus FPP 3
x—— insgesamt extrahiert
+---- bei jedem Schritt extrahiert

Daß diese Angaben tatsächlich zutreffen und daß sich zugesetztes radioaktives und endogen im biologischen Material enthaltenes LCFA-CoA gleich verhalten, wurde durch Verseifung der eingeengten Extrakte mit anschließendem CoA-Test bewiesen (s.Tab.37). Bei Eichung mit internem Standard ergab sich, daß mit 6 E2-Extraktionen 31,4 % des Ausgangswerts an unlöslichem CoA extrahiert wurden. Der bereits mit 1o Aceton-Extraktionen herausgelöste PCoA-Anteil wurde im selben Experiment zu 12,2 % bestimmt.

Kehrt man die Reihenfolge der Extraktionsmittel um (Kombination E2/Aceton), so erhält man natürlich keine differentielle Extraktion mehr, sondern es wird wegen der Unspezifität von E2 nur eine Sättigungskurve erhalten, die von Anfang an dem Wert von 1oo %

Tab.36: Differentielle Extraktion von 1-^{14}C-Palmitinsäure und 1-^{14}C-PCoA aus biologischem Material
(alle Angaben in % der eingesetzten Ipm)
Extraktionsprozedur B (s.6.5.1.)
E2 ≙ Pyridin:Isopropanol:Wasser = 1:1:2
Nach der letzten aufgeführten Extraktion mit dem 1.Extraktionsmittel wurde sofort die erste Extraktion mit dem 2.Extraktionsmittel angeschlossen.

Material	Extraktionen	Zahl der Extraktionen 1	2	3	4	5	6	7	8	9	1o
Exp.1 FPP 3	zuerst mit E2	41,2	59,5	71,6	81,9	89,1	92,4	-	-	-	-
	dann mit Aceton	94,o	95,1	-	-	-	-	-	-	-	-
Exp.2 FPP 3 (s.Abb.56)	zuerst mit Aceton	32,1	42,7	47,1	5o,8	52,2	-	-	-	-	-
	dann mit E2	75,2	85,9	95,5	96,8	97,9	-	-	-	-	-
Exp.3 FPP 3	zuerst mit Aceton	16,7	21,o	23,1	24,2	-	-	-	-	-	-
	dann mit E2	42,1	53,6	61,5	73,6	8o,8	87,6	92,3	-	-	-
Exp.4 FPP 3-$HClO_4$-Niederschlag	zuerst mit Aceton	36,1	47,5	51,4	54,9	56,9	-	-	-	-	-
	dann mit E2	61,1	7o,6	76,2	83,o	86,8	-	-	-	-	-
Exp.5 Schweineleberlyophilisat-$HClO_4$-Niederschlag	zuerst mit Aceton	2o,2	31,1	39,5	44,o	47,4	49,o	49,9	5o,4	51,1	51,7
	dann mit E2	53,5	54,7	55,9	57,8	61,3	66,3	7o,9	76,6	81,8	85,4

Tab.37: Differentielle Extraktion von unlöslichem CoA aus Schweineleberlyophilisat-$HClO_4$-Niederschlag (Test b4 aus Tab.5)

Eichung	Ausgangswert (nMol/g TG)	Extraktion	unlsl.CoA extrahiert (nMol/g TG)	in %	Extraktsumme (nMol/g TG)	in %
extern	39,o±4,4(4)	1) 1oxAceton	4,9±3,1(6)	12,6		
		2) 6xE2	7,5±3,o(6)	19,2	12,4	31,8
intern	58,3	1) 1oxAceton	7,1	12,2		
		2) 6xE2	18,3±2,1(2)	31,4	25,4	43,6

der eingesetzten Radioaktivität zustrebt (s.Tab.36). Ein Wechsel zu Aceton hat dann keinen Effekt mehr, weil nach einigen E2-Extraktionen auch die gesamte 1-^{14}C-Palmitinsäure schon extrahiert ist.

Die anfangs durch Aceton nicht extrahierte, also nicht von vornherein als 1-^{14}C-Palmitinsäure vorliegende Radioaktivität kann ohne Anwendung von E2 extrahiert werden, wenn - wie im Säureaufschluß (s.Kapitel 4.2.) - verseift, mit $HClO_4$ versetzt und zentrifugiert wird (der Radioaktivitätsverlust im $HClO_4$-Überstand betrug nur 1,6%), und der $HClO_4$-Niederschlag weiter mit Aceton extrahiert wird (s.Abb.57). Der Verlauf entspricht dem in Abb.56, nur mit dem Unterschied, daß in der 2.aufgesetzten Sättigungskurve nicht 1-^{14}C-PCoA, sondern die durch Verseifung aus diesem entstandene 1-^{14}C-Palmitinsäure gemessen wird. Der Extraktionsverlauf nähert sich auch hier 1oo %; ein weiterer Beweis dafür, daß die in 4.2. angewandte Verseifungsprozedur vollständig ist.

Ein ähnliches Bild lieferte bereits Abb.48: Dort wurde mit $HClO_4$ das ursprünglich vorhandene und nach Verseifung das aus unlöslichem CoA freigesetzte lösliche CoA extrahiert. Abb.48 und Abb.57 haben gemeinsam, daß Extraktionsmittel ($HClO_4$ bzw.Aceton) angewandt werden, die LCFA-CoAs nicht oder nur zu einem geringen Ausmaß lösen, dagegen gute Extraktionsmittel für je eine der in LCFA-CoA enthaltenen Komponenten (CoA bzw. FFA) sind, die als Verunreinigung ebenfalls im Präparat vorkommen und daher zunächst einmal vollständig extrahiert werden; danach wird verseift und die neu bei der Hydrolyse der LCFA-CoA entstandene Komponente mit dem gleichen Lösungsmittel extrahiert.

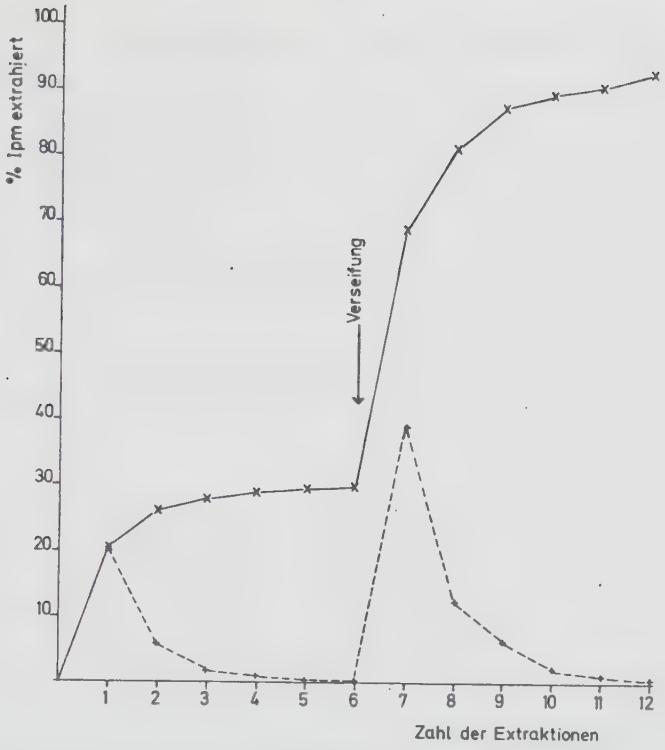


Abb.57: Extraktion von Radioaktivität aus FPP 3 (1-^{14}C-Palmitinsäure und 1-^{14}C-PCoA zugesetzt) mit Aceton vor und nach der Verseifung
x—— insgesamt extrahiert
+---- mit jedem Schritt extrahiert

In (139) werden die Herstellung von Lipidextrakten und verschiedene Methoden zur Entfernung von Nichtlipiden daraus beschrieben, die teilweise auch auf unser Problem Anwendung finden können.
In die Kategorie "Fest-Flüssig-Verteilung" fällt noch die Ausfällung mit Trichloressigsäure. Dabei werden die Lipide zusammen mit Proteinen ausgefällt; viele Nichtlipide bleiben im Überstand. Da $HClO_4$ in dieser Hinsicht ähnliche Eigenschaften besitzt, kann man davon ausgehen, daß aus Extrakten von $HClO_4$-Niederschlägen ein Großteil der Nichtlipide bereits entfernt ist. Weitere Methoden sind die Entfernung von Nichtlipiden durch Lösungsmittelverteilung nach (112) und durch Dialyse (s.5.2.2.) sowie die Entfernung durch Gelchromatographie (s.5.2.3.).

5.2.2. Reinigung durch Flüssig-Flüssig-Verteilung

Die Trennung von 1-^{14}C-PCoA und 1-^{14}C-Palmitinsäure mit der Prozedur nach (111) ist schon in 3.4.2. behandelt worden, einschließlich der Wiederfindungen bei Zugabe zu gegen Wasser dialysiertem E2-Extrakt aus FPP 1 und Schweineleber-Lyophilisat. Die Oberphase, in der sich der Hauptteil der 1-^{14}C-Palmitinsäure befindet, enthält fast alle ursprünglich im E2-Extrakt vorkommenden Lipidspezies (Neutral- und Phospholipide). Die mit 1-^{14}C-PCoA angereicherte Unterphase enthält keinerlei Neutrallipide, aber noch einige Phospholipide, besonders bei dem Versuch mit Leberextrakt. Als zusätzliche Reinigungsmethode ist dieses Verfahren durchaus erwägenswert, besonders für Hefeextrakte.

Das Prinzip der Folchtrennung sowie das Verhalten der LCFA-CoA-Fraktion dabei ist ebenfalls bereits in 3.4.2. behandelt worden. Die von J.Folch et al.(112) beobachtete Trennung von Lipiden und Nichtlipiden ist leider nicht quantitativ, da manche Lipide gleichermaßen in Wasser und in organischen Lösungsmitteln löslich sind; sonst könnte man in einem Schritt eine vollständige Abtrennung der LCFA-CoAs aus einem Lipidextrakt erreichen. Nach (41) wurden in der FUP bisher folgende Verbindungen gefunden: Nichtlipide wie Glucose, Saccharose, Salze, Harnstoff; Ganglioside und kleine Mengen einiger anderer hochpolarer Lipide, sowie verschiedene Mengen an Glykolipiden. K.S.Bjerve beobachtete bei Folchextraktion und -trennung einen selektiven Verlust der Lysophospholipide (LPA, LPC, LPE und LPS) in Abhängigkeit vom pH-Wert und von der Konzentration an zweiwertigen Kationen (14o); Erniedrigung des pH-Werts im Chloroform-Methanol-Gemisch erhöht die Ausbeute an LPA in der FLP. K.Christiansen (88) fand in der FUP Acyl-CoAs und kleinere Mengen an FFA, Monoglyceriden und Phospholipiden. Er trennte den Gesamtlipidextrakt daher nach einer anderen Methode auf (in einen "Chloroform-Extrakt" und einen "Methanol-Extrakt"), fand aber unter identischen Bedingungen um bis zu 2o % variierende Verteilungen der zugesetzten bzw. in einer Inkubationsmischung gebildeten markierten Verbindungen in den beiden Extrakten. Die Flüssig-Flüssig-Verteilung von Lipiden verschiedener Polarität wird von Art und Menge der anderen Lipide in der Inkubationsmischung stark beeinflußt.

Weitere Ursachen für Verluste bei der Folchprozedur sind die Bildung eines sog."interfacial fluff" zwischen FLP und FUP, der zu einem großen Teil aus Proteolipiden besteht, sowie die Neigung der Phospholipide zur Bildung stabiler Emulsionen. Bei jedem Waschen der FLP mit theoretischer FUP treten bis zu 1o % Verlust an Gesamt-Lipidphosphat auf (141). Der Verlust kann geringer gehalten werden, wenn man der für die Waschprozeduren verwendeten theoretischen FUP o,o4 % $CaCl_2$ oder o,74 % KCl zusetzt.

Für die Abtrennung der LCFA-CoA-Verbindungen aus Lipidextrakten ist die Folchprozedur nicht besonders gut geeignet, da in diesen Extrakten enthaltene Bestandteile die theoretisch zu erwartende Verteilung (LCFA-CoAs in der FUP, Phospholipide in der FLP) erheblich stören können. Bei der Folchfraktionierung von Hefe- und Leberextrakten, zu denen radioaktives PCoA zugesetzt wurde, fanden wir oft einen Großteil der Radioaktivität in der FLP wieder. HPTLC in Laufmittel A und E zeigte, daß es sich dabei nicht um durch Zersetzung entstandene 1-^{14}C-Palmitinsäure, sondern um unverändertes 1-^{14}C-PCoA handelte. Will man einen beliebigen Extrakt also nach Folch fraktionieren und sind die LCFA-CoA-Mengen auf dieser Stufe noch zu klein für deren dünnschichtchromatographische Auffindung, so kann man die Frage, ob FUP oder FLP weiterverarbeitet werden soll, nur entscheiden, indem man ein Aliquot des Extrakts mit 1-^{14}C-PCoA versetzt, dieses Aliquot nach Folch fraktioniert und den Verbleib der Radioaktivität untersucht.

Bei einer eingehenderen Untersuchung zeigte sich, daß der Gehalt der FUP an 1-^{14}C-PCoA bei Zugabe von Hefe- oder Leberextrakten (mit oder ohne Lösungsmittel) abfällt (s.Abb.58). Zugabe von zur Trockene eingeengten Extrakten hat keine so große Wirkung wie Zugabe des unveränderten E2-Extrakts. Bei einem Gesamtvolumen (FUP + FLP) von etwa 12 ml erniedrigen 1oo µl Schweineleber-Lyophilisat-E2-Extrakt (aus 1 g Schweineleber-Lyophilisat und 1o ml E2 gewonnen) den 1-^{14}C-PCoA-Gehalt in der FUP bereits auf 58 %. Einen besonders starken Effekt erhielten wir bei Folchtrennung von 1-^{14}C-PCoA zusammen mit 1o mg rohem Lecithin (aus Eiern): Die FUP enthielt nur noch 22,8 %, die FLP 73,9 % der eingesetzten Radioaktivität. Mögliche Gründe für diese Veränderungen sind (für die Wirkung von E2) die Änderung des pH-Wertes der wäßrigen Phase durch Pyridin und damit die Änderung des Ionisa-

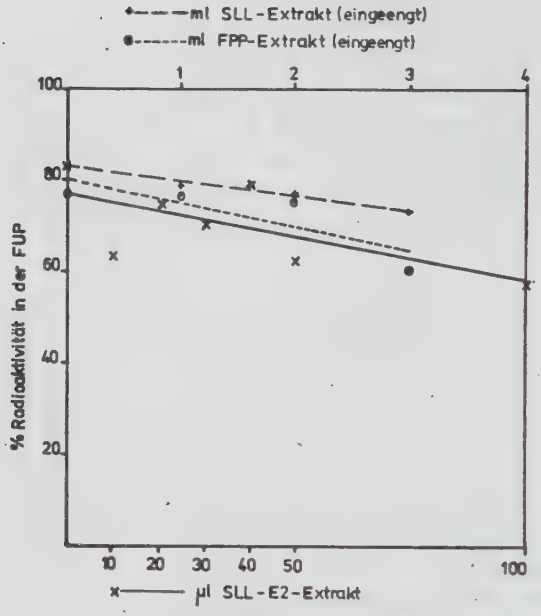


Abb.58: Veränderungen im Gehalt der FUP an 1-^{14}C-PCoA

tionszustands des PCoA-Moleküls bzw. (für die Wirkung der Phospholipide) die Bildung von gemischten Micellen.

Ein weniger häufig angewandtes Verfahren zur Reinigung von Lipid- (meist Chloroform-Methanol-)Extrakten ist deren Dialyse gegen Wasser. Nach (139) werden die Nichtlipide dabei entfernt, Lipide, auch die wasserextrahierbaren Lipide, behalten; auch nach (142) sind Phospholipide nicht dialysierbar, innerhalb von 1 bis 4 Tagen sollen allerdings Triglyceride, FFA und Monoglyceride dialysieren. Nach unseren Beobachtungen dialysiert 1-^{14}C-PCoA nicht, so daß LCFA-CoA-Extrakte auf diese Weise von Nichtlipiden, (dem teilweise dialysierbaren) CoA und von hartnäckigen Pyridinresten befreit werden können; allerdings können bis zu 5o % des PCoA am Cellophanschlauch hängen bleiben.

5.2.3. Reinigung durch chromatographische Verfahren

In Tab.38 sind mehrere säulenchromatographische Trennungen von Lipiden mit den entsprechenden Literaturstellen stichpunkt-

Tab.38: Säulenchromatographie von Lipiden

Literatur	Säule	aufgetrennt
(143)	Al_2O_3	basische Lipide (PC, PE)
(144)	Kieselgel	Neutral-, Phospholipide
(145)	Kieselgel	Milch-Phospholipide
(146)	Kieselgel	Cerebroside
(147,148)	Cellulose	Phospholipide
(149)	Cellulose	2,4-dinitrophenylierte und methylierte Phospholipide
(15o)	Kieselgur ("Extrelut")	PC, SM
(151)	Florisil	Cerebroside
(152)	Polystyrol + 2 % Divinylbenzol	Phospholipide
(153)	Sepharose	Lipopolysaccharide
(154)	methyliertes Sephadex	Phospholipide, Lipopeptide und Glykolipide
(141)	Sephadex LH-2o	Lipidextrakte
(155)	Sephadex LH-2o	FFA, PI, (SM + PC), (PS + PE), Chloroplastenpigmente
(148)	Sephadex LH-2o	Phospholipide
(156)	Sephadex LH-2o	Gehirnlipide
(143)	DEAE-Cellulose	DPG, (PI + PG), PS
(118,13o)	DEAE-Cellulose	Phospholipide
(157,158)	DEAE-Cellulose	Ganglioside
(13o,159)	TEAE-Cellulose	Phospholipide
(16o)	DEAE-Sephadex LH-2o	PE, PG, DPG (Escherichia coli)
(161)	Dibutylaminohydroxypropyl-Sephadex LH-2o	Eier-Phospholipide
(162)	alkalische Hydrolyse + + Kieselgel	Phosphoglyceride
(163)	Kieselgel + Ultrazentrifuge	Lipoproteine
(164)	Kieselgel + präparative Dünnschichtchromatographie	Prostaglandine
(165)	Kieselgel mit Intervereste-rung von Phospholipiden + + Al_2O_3	SM
(166)	Kieselgel + DEAE-Cellulose	DPG, PE, PG (Escherichia coli)
(167)	Kieselgel + DEAE-Cellulose oder Al_2O_3 neutral	Serumlipide (Neutrallipide, PE, PS, PC, SM, LPC)
(168)	DEAE-Cellulose + Kieselgel	Phospholipide
(169,17o)	HPLC	Phospholipide

artig aufgeführt. Vor der eigentlichen Lipidchromatographie kann Nichtlipidmaterial über eine Sephadexsäule entfernt werden. Neutrallipide lassen sich gut auf Kieselgelsäulen mit Äther-Petroläther-Mischungen trennen. Die gängigsten Verfahren für Phospholipide sind nach (13o) die Kieselgel-Säulenchromatographie mit einem Gradienten von Methanol in Chloroform und die Ionenaustauschcellulose-Säulenchromatographie. Beide Verfahren werden zweckmäßig mit Dünnschichtchromatographie, einer anderen säulenchromatographischen Trennung oder mit beiden kombiniert.

a) Entfernung von Nichtlipiden mit Hilfe von Sephadex (s.3.4.3.d))

In (139) ist eine sephadexchromatographische Abtrennung von Nichtlipiden unter Verwendung von theoretischer FUP und FLP beschrieben, die von uns aber nicht durchgeführt wurde. Das analoge Batch-Verfahren mit Sephadex G-25 nach (116) ist dagegen bereits in 3.4.3.d) kurz beschrieben worden. Bei entsprechender Auftrennung eines Chloroform-Methanol-Extrakts aus 1 g Schweineleber-Lyophilisat enthielt das Chloroform-Eluat fast alle Phospholipide und Neutrallipide, das Methanol-Eluat einige Phospholipide und das Wasser-Eluat zahlreiche nichtidentifizierte Komponenten (festgestellt mit zweidimensionaler HPTLC, Kombination B/E). Da aus dem Kontrollversuch mit reinem 1-^{14}C-PCoA ein Gehalt des Methanol- und Wasser-Eluats an Acyl-CoAs wahrscheinlich gemacht worden war, trennten wir Methanol- und Wasser-Eluat mit der Folchprozedur weiter auf. Die FUP des Methanol-Eluats ergab in der zweidimensionalen HPTLC (Laufmittelkombination E/C) nur 2 fluoreszenzlöschende Flecken, von denen einer mit 9,1o-^{3}H-PCoA gleichlief. Das UV-Spektrum war allerdings etwas verzerrt: das Maximum lag bei 25o nm. Interessanterweise ergab die FUP des Wasser-Eluats im wesentlichen das gleiche Spektrum, obwohl sie sich in der zweidimensionalen HPTLC als Gemisch zahlreicher Komponenten auswies.

Setzten wir zusammen mit Schweineleberlyophilisat-Chloroform-Methanol-Extrakt 1-^{14}C-PCoA als Marker ein, so fanden wir die Radioaktivität nach der Elution merkwürdigerweise zu 6o % im Chloroform-Eluat wieder und nur zu 12,5 % im Methanol-Eluat. Die unerwartete Löslichkeit von PCoA in Chloroform könnte auf Bildung von Mischmicellen mit Phospholipiden und/oder durch mitgeschleppte Spuren von Methanol aus dem Extraktionsmittel zurück-

zuführen sein; die Konzentration des 1-^{14}C-PCoA im Chloroform wurde zu ca.1 µM berechnet. Sowohl im Chloroform- als auch im Methanol-Eluat waren neben 1-^{14}C-PCoA alle Phospholipide enthalten, so daß sich die Gesamttrennung als wenig brauchbar erwies. Da die Reinigung der LCFA-CoA-Fraktion inzwischen bereits auf anderem Wege gelungen war (s.5.2.5.), verzichteten wir auf weitere Untersuchungen mit Sephadex.

b) Kieselgelchromatographie (s.3.4.3.c) und a))

Das Verhalten von 1-^{14}C-PCoA bei der Säulenchromatographie auf Kieselgel bei stufenweiser Erhöhung des Methanolanteils im Elutionsmittel Chloroform oder Methylenchlorid und bei Anwendung eines entsprechenden Gradienten ist bereits in 3.4.3.c) behandelt worden. Die Auftrennung saurer Phospholipide in diesem System, das von vielen Autoren benutzt wurde (s.Tab.38), stößt nach (159) auf folgende Hindernisse:

1) Die einzelnen Lipidklassen werden nur unvollständig getrennt, d.h. ein Gipfel kann aus mehreren Lipidklassen bestehen.

2) Umgekehrt kann auch eine Lipidklasse in mehr als einem Gipfel eluiert werden.

3) Einfluß von Ionen (Na^+, K^+, Ca^{2+}, Mg^{2+}) führt zu Gipfelverbreiterung.

T.Shimojo et al. (148) untersuchten eingehend das Elutionsverhalten saurer Phospholipide bei säulenchromatographischer Trennung auf Kieselgel, Cellulose und Sephadex LH-2o. Sie fanden einen sekundären Effekt der gebundenen Kationen; Unterschiede im chromatographischen Elutionsverhalten zwischen verschiedenen kationischen Formen von sauren Phospholipiden beruhen auf Unterschieden in der Stabilität und Polarität von Micellen. So sind Ca^{2+}- und Mg^{2+}-Micellen stabiler und weniger polar als Na^+- und K^+-Micellen, d.h.sie werden mit einem weniger polaren Lösungsmittel eluiert. Da Art und Konzentration der in Lipidextrakten vorkommenden Ionen normalerweise unbekannt ist, ist keine gesicherte Voraussage über das Elutionsverhalten ihrer Komponenten möglich. Da LCFA-CoAs in gewissem Sinne zu den Phospholipiden gerechnet werden können - in Bezug auf ihre Nettoladung (4fach negativ) stehen sie etwa zwischen PI-phosphat und PI-diphosphat - sind ähnliche Schwierigkeiten auch für sie zu erwarten.

Aus den verschiedenen Literaturangaben über Micelleneigenschaften von Phospholipiden ergibt sich ein recht kompliziertes Bild (41, 127); bei PC gibt es beispielsweise Abhängigkeiten von:

1) Herkunft:

Lecithin aus Eiern bildet in Äthanol Micellen aus PC_3-, in Methanol solche aus PC_9-Einheiten. Synthetisches 1,2-Dipalmityl-PC dagegen bildet in beiden Lösungsmitteln keine Micellen. Grund hierfür ist das Vorhandensein ungesättigter Fettsäurereste in natürlichem Lecithin.

2) Konzentration:

In Benzol liegt die CMC bei o,2 g PC/l. Bei einer Konzentration von o,2 bis o,73 g/l treten PC_4-Einheiten, bei > o,73 g/l PC_{75}-Einheiten auf.

3) Temperatur:

Aus den PC_{75}-Micellen bei 2o°C entstehen bei 4o°C PC_{54}-Micellen und bei 8o°C (in siedendem Benzol) schließlich Monomere.

4) Dielektrizitätskonstante des Lösungsmittels:

Bei einer Dielektrizitätskonstante von ca.3o liegen einzelne Moleküle vor (bei 2o°C). Je mehr diese Konstante vom Wert 3o nach oben oder unten abweicht, desto größer werden die gebildeten Micellen. Oberhalb des Micellengrößenminimums werden hydrophile, unterhalb hydrophobe Micellen gebildet.

5) Art des Lösungsmittels:

In wäßrigen Lösungen bildet PC - im Gegensatz zu Seife, LPC oder PCoA - keine Micellen, sondern liegt in Form geschlossener multilamellarer Vesikel aus 19oo bis 27oo PC-Molekülen vor. Eine aus Phospholipiden und Wasser erhaltene milchige Dispersion ergibt zwar nach Ultraschallbehandlung eine optisch klare Lösung; diese ist aber immer noch polydispers und enthält alle möglichen Partikel, Vesikel, Sphärulen und Liposomen, aber kaum freie Moleküle, so daß sich eine CMC nicht bestimmen läßt.

LCFA-CoAs wurden bisher noch nicht so eingehend auf ihre Micelleneigenschaften untersucht. In (76) ist für käufliches PCoA eine konstante und reproduzierbare Micellengröße aus 1ooo Einheiten angegeben; bei Kieselgel-Säulenchromatographie steigt sie auf etwa 85ooo PCoA-Einheiten und wird in weiten Bereichen variabel.

Aus diesen Angaben geht bereits hervor, daß eine säulenchromatographische Trennung von LCFA-CoAs und Phospholipiden auf

Kieselgel auf große Schwierigkeiten stoßen muß und, wenn überhaupt, nur im Verein mit anderen chromatographischen Methoden zu bewältigen sein wird. Zudem kann die Bildung gemischter Micellen nicht ausgeschlossen werden.

Um uns ein Bild von den zu erwartenden Schwierigkeiten zu machen, trennten wir nach der veränderten Vorschrift in (114) (s.3.4.3.c)) eingeengte und in Chloroform:Methanol = 3:1 aufgenommene E2-Extrakte aus Rattenleber und Hefe auf, allerdings ohne zugesetztes radioaktives PCoA. Die Detektion erfolgte durch Extinktionsmessung bei 260 nm sowie durch Dünnschichtchromatographie der erhaltenen Fraktionen. Es traten zwar Maxima der Elution von Lipiden auf; die meisten Neutrallipide wurden bei 0 bis 30 % Methanol, die meisten Phospholipide bei 50 bis 60 % Methanol eluiert. Jedoch traten auch bei fast allen anderen Chloroform-Methanol-Verhältnissen Neutrallipide und Phospholipide auf, so daß eine Abtrennung der LCFA-CoAs aus Lipidextrakten auf diese Weise als wenig aussichtsreich erschien und daher nicht weiter verfolgt wurde.

Die präparative Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel erwies sich dagegen wegen des hohen Auflösungsvermögens, der Möglichkeit der Ausnutzung der unterschiedlichen Eigenschaften der verschiedensten Laufmittel sowie der problemlosen Detektion und Elution als die Methode der Wahl für die Isolierung der LCFA-CoA-Fraktion. Das prinzipielle Vorgehen bei der präparativen Dünnschichtchromatographie wurde bereits in 3.4.3.a) behandelt. Für eine stufenweise Abtrennung von Lipiden aus LCFA-CoA-haltigen Extrakten sind besonders Laufmittel A und B geeignet, da LCFA-CoAs hierbei am Start bleiben. Anschließend kann der Startfleck - bei Platten mit Konzentrierungszone und bei Verwendung von Laufmittel B die Grenzschicht Kieselgur/Kieselgel - eluiert und das konzentrierte Eluat durch präparative Dünnschichtchromatographie in Laufmittel E (oder C) nochmals gereinigt werden. Der Verlauf der Reinigung kann durch zweidimensionale HPTLC (Kombination B/E) kontrolliert werden.

c) Andere Verfahren

Die Ionenaustauscher-Säulenchromatographie auf DEAE-Cellulose, die in 3.4.3.e) für die Reinigung von synthetischem 1-^{14}C-PCoA

verwendet worden war, birgt nach K.Sandhoff (persönliche Mitteilung) für die Auftrennung komplexerer Lipidgemische noch größere Schwierigkeiten als die Kieselgelchromatographie. Die unterschiedlichen ionogenen Eigenschaften der Phospholipide sollten zwar ideale Bedingungen für Ionenaustauscherchromatographie liefern; im folgenden sind einige saure und basische Gruppen mit ihren pK-Werten aufgeführt:

sauer:	$-PO_4^{2-}$	pK	2,1	Bsp.: PA, PI-diphosphat, LCFA-CoA
	$-HPO_4^{-}$		7,2	PC, PE, PG, SM, LCFA-CoA
	$-COO^{-}$		2,2	PS
basisch:	$-NH_3^{+}$		1o,6	PE
	$-N(CH_3)_3^{+}$		13,9	PC, SM

Wie bereits in 5.2.3.b) ausgeführt, liegen Phospholipide und LCFA-CoAs aber in Micellen sehr unterschiedlicher und wechselnder Größe vor. Durch Bildung gemischter Micellen sowie durch Einbau von Neutrallipiden - Eierlecithin-Vesikel können beispielsweise Cholesterol bis zum Verhältnis 1:1 inkorporieren - werden sehr stark variable und nicht kontrollierbare spezifische Oberflächenladungen erhalten, nach denen der Ionenaustauscher letztendlich auftrennen muß. Außerdem konzentrieren sich im Verlauf des chromatographischen Prozesses bestimmte Lipide oder Lipidmischungen an bestimmten, langsam wandernden Stellen der Säule, so daß an manchen Stellen die CMC über-, an anderen unterschritten wird; die sehr komplizierte Gleichgewichtseinstellung zwischen Monomeren, kleinen und großen Micellen muß also ebenfalls berücksichtigt werden. Aus diesen Gründen verzichteten wir schließlich auf eine genauere Untersuchung der ionenaustauscherchromatographischen Trennung von Lipidgemischen.

Wir versuchten auch eine Trennung auf den Kieselgur enthaltenden "Extrelut"-Fertigsäulen der Firma Merck, Darmstadt. Nach Auftragen eines E2-Extraktes von Schweineleberlyophilisat (einmal unverändert und einmal in Wasser überführt) wurde entsprechend den Firmenangaben (15o) zunächst mit Chloroform und dann mit gesättigter NaCl-Lösung eluiert. In beiden Fällen enthielt das Chloroform-Eluat fast nur PC (neben Spuren anderer Phospholipide); das wäßrige Eluat war fast genauso unrein wie der rohe Extrakt (hauptsächlich Flecke von Phospholipiden). Da kaum Reinigung erzielt wurde, untersuchten wir den Verbleib von zugesetztem 1-^{14}C-PCoA nicht näher.

5.2.4. Reinigung auf enzymatischem Wege

Die einer Reinigung auf enzymatischem Wege zugrundeliegende Idee ging davon aus, daß Phospholipide und Acyl-CoA-Thiolester deswegen so ähnlich und daher so schwer voneinander zu trennen sind, weil beide Verbindungsgruppen aus einem hydrophilen und einem hydrophoben Molekülteil bestehen; dies ist auch die Ursache für den Detergentiencharakter und die Tendenz zur Micellenbildung. Es sollte nun möglich sein, mittels einer spezifischen enzymatischen Reaktion die - mit Ausnahme von SM im Prinzip alle gleich aufgebauten - Phospholipide in einen unpolaren und einen polaren Teil zu spalten, ohne die LCFA-CoA-Verbindungen chemisch zu verändern. Von den zur Verfügung stehenden Phospholipasen kommt nur Phospholipase C in Frage, die beispielsweise PC an der Phosphomonoesterbindung zwischen Diglycerid- und Phosphorylcholinteil spaltet. Mit Phospholipase D würde PA entstehen, mit Phospholipase A_1 2-Acyl- und mit Phospholipase A_2 1-Acyl-sn-glycero-3-phosphorylcholin (LPC); alle diese Verbindungen haben noch ähnliche Eigenschaften wie die häufigeren Phospholipide. Diglyceride gehören dagegen zu den Neutrallipiden und lassen sich daher in allen relevanten Dünnschichtchromatographie-Systemen leicht von ihrem Phospholipidvorläufer und auch von Acyl-CoA abtrennen.

Phospholipase C (systematischer Name: phosphatidylcholine cholinephosphohydrolase, E.C.3.1.4.3) kommt in Bakterien- und Schlangengiften sowie in tierischen Geweben wie Gehirn und Darmschleimhaut vor. Der Gehalt in Rattenleberlysosomen ist wahrscheinlich für den in 4.1.1. erwähnten raschen Abbau der Phospholipide in der Leber verantwortlich. Angaben über Wirkung und Spezifität der Enzympräparationen aus den Bakterienarten Clostridium perfringens und Bacillus cereus werden in (41,127,171) gemacht. Beide Enzyme, besonders aber das Enzym aus Clostridium perfringens, sind nur bei einem positiven ζ-Potential aktiv. Aktivierend wirken daher langkettige Kationen sowie polyvalente Kationen wie Ca^{2+} oder Mg^{2+}, daneben auch Äther; inhibierend wirken langkettige sowie polyvalente Anionen, außerdem Trispuffer. Unser Standardansatz enthielt daher o,1 M Triäthanolamin-Puffer pH 7,5, 2o mM an $CaCl_2$; außerdem mußte mit Ultraschall behandelt werden, um die Phospholipide zu dispergieren (s.5.2.3.b)) und dem Angriff des Enzyms zugänglich zu machen.

Auch unter optimalen Bedingungen kann das Enzym aus Clostridium perfringens jedoch nicht alle Phospholipide umsetzen. Ohne weiteres reagiert es nur mit den elektrisch neutralen bzw. im Sauren wegen des quaternären Ammoniumions positiv geladenen Spezies PC, SM, CP, LPC und 1,3-Diacyl-sn-glycero-2-phosphorylcholin (wahrscheinlich wegen der Notwendigkeit eines positiven ζ-Potentials). Es reagiert nicht mit dem negativ geladenen PG und mit Glycerylphosphorylcholin; letzteres ist zwar elektrisch neutral, bildet wegen fehlender Acylreste aber keine Micellen. Die zwar wie die Cholin enthaltenden Phospholipide neutralen, aber kein obligatorisch positiv geladenes Stickstoffatom enthaltenden Äthanolamin-Phosphatide werden nur in Mischmicellen zusammen mit anderen Phospholipiden umgesetzt: Für PE ist Zusatz von PC oder LPC, für EP Zusatz von LPC erforderlich. Eine Reaktion mit den negativ geladenen Phospholipiden PS und PI ist noch fraglich.

Wegen dieser Schwierigkeiten zogen wir das ebenfalls käufliche Enzym aus Bacillus cereus vor, das unter optimalen Bedingungen - wenn auch mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten - PC, PE, PG, DPG, CP, EP und SM umsetzt. Abb.59, I und II, zeigt die Einwirkung von Phospholipase C auf Lecithin aus Eiern, das neben PC noch PE enthält (HPTLC Laufmittel A und D). Eine ähnlich vollständige Reaktion konnten wir auch bei der Einwirkung auf FPP-Chloroform-Methanol- und -E2-Extrakt beobachten (hier nicht abgebildet). Bei Einwirkung auf ein Gemisch von PC mit 1-^{14}C-PCoA konnten wir (in Laufmittel B und E; s.Abb.59, III und IV) die gewohnte Reaktion beim PC beobachten, hingegen keine Veränderung der dünnschichtchromatographischen Eigenschaften beim 1-^{14}C-PCoA; das heißt LCFA-CoAs werden von Phospholipase C nicht angegriffen. Dies war auch nicht zu erwarten, da einerseits die Umgebung der Phosphatgruppen im LCFA-CoA-Molekül eine ganz andere ist als in Phospholipiden und da LCFA-CoAs andererseits als langkettige und polyvalente Anionen Phospholipase C wahrscheinlich sogar inhibieren (vgl.oben). Eine eventuelle Spaltung der LCFA-CoAs durch andere Phospholipasen wurde von uns zwar nicht untersucht, ist aber zumindest in E2-Extrakten wenig wahrscheinlich, da das in diesen enthaltene Isopropanol Phospholipasen hemmt (s.5.1.1.); der von den Phospholipasen A_1 und A_2 bevorzugt angegriffene Bindungstyp (O-Esterbindung) ist zudem in LCFA-CoAs gar nicht vorhanden.

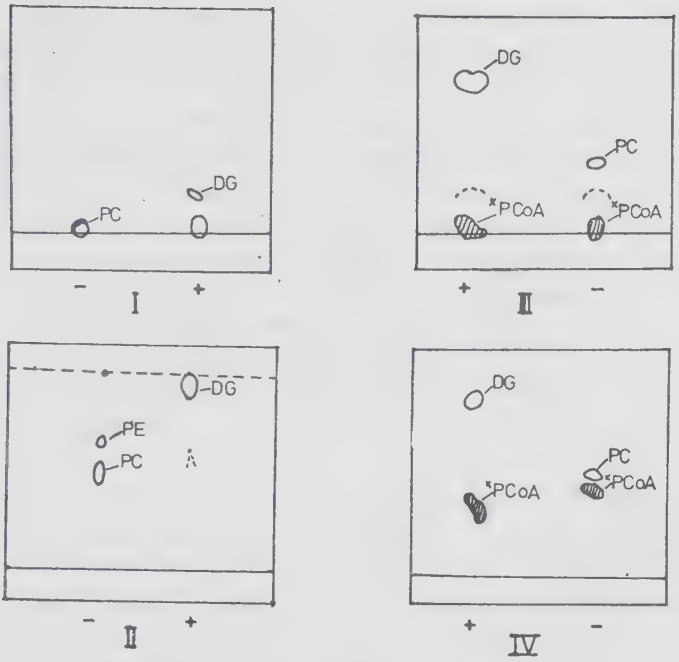


Abb.59: Einwirkung von Phospholipase C aus Bacillus cereus auf Eier-Lecithin und auf 1-^{14}C-PCoA
(- ohne Phospholipase C, + mit Phospholipase C, schraffierte Flächen: radioaktiv
I: Eier-Lecithin, Laufmittel A
II: Eier-Lecithin, Laufmittel B
III: Eier-Lecithin + 1-^{14}C-PCoA, Laufmittel B
IV: Eier-Lecithin + 1-^{14}C-PCoA, Laufmittel E

5.2.5. Isolierung der LCFA-CoA-Fraktion

Für die endgültige Reindarstellung der LCFA-CoA-Fraktion aus biologischem Material kombinierten wir mehrere der in 5.2.1. bis 5.2.4. beschriebenen Methoden miteinander, insbesondere $HClO_4$-Fällung, differentielle Extraktion, die Folchprozedur sowie die präparative Dünnschichtchromatographie. Dies schließt aber nicht aus, daß die in diesem Kapitel nicht verwendeten Verfahren bei späteren Untersuchungen zur Optimierung der Reinigung durchaus Verwendung finden können.

Die Isolierung der LCFA-CoA-Fraktion aus Hefe ging folgendermaßen vor sich:

Wir gingen von FPP 3 aus, das wir mit 6 % $HClO_4$ fällten und mehrmals wuschen; dabei wurden CoASH, CoA-S-S-CoA, Acetyl-SCoA und andere kurzkettige Acyl-CoAs sowie wasserlösliche Nichtlipide entfernt. Der $HClO_4$-Niederschlag wurde mehrmals mit Aceton zur Entfernung der Nichtlipide extrahiert, bis die HPTLC in Laufmittel A negativ ausfiel. Sodann extrahierten wir den Acetonrückstand so lange mit E2, bis bei HPTLC in Laufmittel B keine Phospholipidflecken mehr auftraten. Der E2-Extrakt wurde eingeengt, in Wasser aufgenommen und gegen Wasser dialysiert. Dieser Schritt hätte wegen der anfänglichen $HClO_4$-Fällung wahrscheinlich auch unterbleiben oder durch eine weitere $HClO_4$-Fällung ersetzt werden können; wird das FPP 3 ohne $HClO_4$-Fällung direkt mit Aceton und E2 extrahiert, so darf der Dialyseschritt jedoch auf keinen Fall ausgelassen werden.
Das Dialysat wurde nach Folch getrennt; aus der HPTLC-Analyse der entstehenden Phasen sowie aus einem Kontrollversuch mit zu einem Aliquot zugesetztem 1-^{14}C-PCoA ging hervor, daß die LCFA-CoAs in die FUP gingen; in der FLP waren die Phospholipide angereichert. Die FUP war sogar bereits dünnschichtchromatographisch rein; zur Sicherheit schlossen wir jedoch noch zwei präparativ dünnschichtchromatographische Trennungen an: Die FUP wurde in Laufmittel B getrennt, der eluierte Startfleck nochmals in Laufmittel E gereinigt. Das UV-Spektrum des Endprodukts besaß ein Maximum bei 26o nm; das Minimum lag allerdings bei 24o nm, so daß das Verhältnis E_{232}/E_{26o} mit o,9 zu groß war. Dies liegt wahrscheinlich an im Eluat vorhandenen Kieselgelspuren, die bei niedrigeren Wellenlängen absorbieren und sich nicht völlig entfernen lassen (s.3.4.3.b)).

Besonders bei radiochemischer Kontrolle der Reinigung durch Zugabe von 1-^{14}C-PCoA zu Schweineleberlyophilisat und anschließender Chloroform-Methanol- oder E2-Extraktion ohne vorherige $HClO_4$-Fällung stellten wir bei längerer Versuchsdauer oft fest, daß wir nur noch 1-^{14}C-Palmitinsäure vorliegen hatten. Eine nähere Untersuchung zeigte, daß im Schweineleberlyophilisat anscheinend sehr aktive Thioesterasen enthalten sind. Dies deckt sich mit den Beobachtungen in (172), daß bei Fraktionierung von Rattenleberhomogenat über eine Sephadexsäule zugesetztes radioaktives PCoA zum größten Teil zersetzt wird. Es ist also empfehlenswert,

möglichst mit einer $HClO_4$-Fällung zu beginnen, obwohl sich LCFA-CoAs aus $HClO_4$-Niederschlägen relativ schwerer extrahieren lassen.

Zweckmäßig war also für Schweineleber-Lyophilisat ebenfalls folgender Anreicherungsgang:
Fällung und Extraktion mit $HClO_4$;
Extraktion des Niederschlags mit Aceton (dieser Schritt kann evtl. weggelassen werden, da Neutrallipide mit E2 nur zu einem geringen Ausmaß extrahiert werden und auch dünnschichtchromatographisch leicht entfernt werden können);
Extraktion des Rückstands mit E2;
Dialyse des Extrakts gegen Wasser;
Gefriertrocknung des Dialysats.

Mit dem lyophilisierten Dialysat (Ausbeute 1,95 g aus 1oo g Schweineleber-Lyophilisat) wurden mehrere Versuche zur weiteren Reinigung unternommen. Eine genaue Übernahme der bei Hefe angewandten Prozedur war nicht möglich, da aus Schweineleberlyophilisat-$HClO_4$-Niederschlag mit E2 Proteine extrahiert werden, die bei Ausführung der Folchprozedur ausfallen und LCFA-CoAs mit sich reißen. Wir versuchten u.a., das Dialysat mit Chloroform:Methanol = 2:1 zu extrahieren; nach der ersten Extraktion erhielten wir jedoch eine kittartige, schwer weiter zu extrahierende Masse, die erst mit Aceton wieder hinreichend körnig und extrahierbar wurde. Bei mehrmaliger Anwendung von E2 wurden jedoch wieder die in diesem Extraktionsmittel löslichen, lediglich reversibel denaturierten Proteine extrahiert.

Die Lösung des Problems wurde schließlich in der Extraktion des lyophilisierten Dialysats mit der methanolreicheren und daher polareren Mischung Chloroform:Methanol = 1:2 gefunden. Der gewonnene Extrakt wurde eingeengt und in Chloroform:Methanol = 2:1 aufgenommen; die LCFA-CoAs waren nun in dieser Mischung löslich, da das störende Protein nun zum größten Teil abgetrennt war. Eine Folchtrennung schloß sich an; wegen der zahlreich vorhandenen Phospholipide gingen die LCFA-CoAs diesmal in die FLP, wie durch Aufarbeitung eines Aliquots zusammen mit 1-^{14}C-PCoA festgestellt wurde. Die FLP wurde dann dreimal durch präparative Dünnschichtchromatographie gereinigt; zweimal in Laufmittel B - nach dem 1.Mal waren noch Phospholipide vorhanden - und einmal

in Laufmittel E. Die LCFA-CoA-Zone wurde jedesmal durch Fluoreszenzlöschung und Cochromatographie mit 1-^{14}C-PCoA lokalisiert, abgekratzt und mit E2 und Methanol eluiert; das letzte Eluat wurde eingeengt, der Rückstand in o,1 M Natriumacetat-Puffer pH 5,2 aufgenommen und nochmals abzentrifugiert. Die erhaltene Substanz war im System HPTLC B/E völlig rein. Das UV-Spektrum wies einen Gipfel bei 26o nm auf; wie bei Hefe war das Verhältnis E_{232}/E_{26o} jedoch zu groß (Erklärung siehe dort).

In Tab.39 sind die eben beschriebenen Schritte nochmals tabellarisch aufgeführt; zusätzlich ist die prozentuale Ausbeute an 1-^{14}C-PCoA mit angegeben, das allerdings erst in Schritt 4 zu einem Parallelansatz zugefügt wurde (d.h.bei der Stufe des lyophilisierten Dialysats). Bei einigen Stufen wurde zusätzlich mit Säureaufschluß und kinetischem CoA-Test getestet: 1oo g Schweineleber-Lyophilisat enthielten 5o2o nMol unlösliches CoA (externer Standard) ≙ 1oo %, das lyophilisierte Dialysat von Schritt 4 noch 56o nMol ≙ 11,2 %. Bei diesem Schritt wurde das radioaktive PCoA (44oooo Ipm ≙ 1oo %) zugegeben; im Endprodukt wurden noch 11,4 % der zugesetzten Radioaktivität wiedergefunden; dies bedeutet unter Berücksichtigung der Verluste von Schritt 1 bis Schritt 4 eine Gesamtausbeute von 1,3 % (65,3 nMol). Bei Aufschluß und Test des Endprodukts erhielten wir 52,4 nMol unlösliches CoA ≙ 1,o %; in Anbetracht der vielen durchgeführten Schritte eine sehr gute Übereinstimmung.

Für Rattenleber benutzten wir wegen der geringen aufzuschließenden Menge ein abgekürztes Verfahren: $HClO_4$-Fällung, Extraktion mit Chloroform:Methanol = 1:2, Einengen, Aufnehmen in Chloroform: :Methanol = 2:1, mehrfache präparative Dünnschichtchromatographie in Laufmittel B und E. Die absolute Ausbeute wurde hier nicht bestimmt, da es bei der anschließenden gaschromatographischen Analyse nur auf das Verhältnis der Fettsäurereste und daher lediglich darauf ankam, daß das erhaltene Produkt hinreichend rein war. Dies konnte aber durch zweidimensionale HPTLC sichergestellt werden.

Tab.39: Isolierung der LCFA-CoA-Fraktion aus Schweineleber-Lyophilisat

Schritt	Material	Prozedur	Ipm-%
1	1oo g Schweineleber-Lyophilisat	2x mit 6 % $HClO_4$ extrahieren	-
2	$HClO_4$-Niederschlag	3x mit E2 extrahieren	-
3	E2-Extrakt	dialysieren, lyophilisieren	-
4	1,95 g lyophilisiertes Dialysat	mit 6 % $HClO_4$ extrahieren	1oo,o
5	$HClO_4$-Niederschlag	2x mit Chloroform:Methanol = 1:2 extrahieren	-
6	Chloroform:Methanol = 1:2-Extrakt	einengen, Rückstand 2x mit Chloroform:Methanol = = 2:1 extrahieren	85,6
7	Chloroform:Methanol = 2:1-Extrakt	einengen, Folchprozedur	72,7
8	FUP (aus 7)	verwerfen	1,9
9	FLP (aus 7)	präparative Dünnschichtchromatographie, Laufmittel B; LCFA-CoA-Zone 3x mit E2 extrahieren	7o,7
1o	E2-Eluat	durch Einengen und Wiederauflösen in Methanol und E2 reinigen	45,5
11	gereinigtes E2-Eluat	präparative Dünnschichtchromatographie, Laufmittel B; 1x mit Methanol, 2x mit E2 extrahieren	31,5
12	Methanol-, E2-Eluat	einengen, mit Methanol-Wasser extrahieren	24,2
13	Methanol-Wasser-Extrakt	präparative Dünnschichtchromatographie, Laufmittel E; LCFA-CoA-Zone 2x mit E2 extrahieren	19,8
14	E2-Eluat	einengen, mit o,1 M Natriumacetat-Puffer pH 5,2 extrahieren	15,2
15	wäßriger Überstand (Endprodukt)	-	11,4

5.3. Charakterisierung der LCFA-CoA-Verbindungen aus biologischem Material

5.3.1. Ergebnisse und Vergleich mit Literaturwerten

a) Ergebnisse

Die gereinigten LCFA-CoA-Fraktionen aus Hefe, Schweineleber-Lyophilisat und Leber von gefütterten und fastenden Ratten wurden alkalisch hydrolysiert und die freigesetzten Fettsäuren entsprechend 3.5.3. mit BF_3-Methanol in die Methylester überführt. Ersetzung von BF_3-Methanol durch CH_2N_2 bzw. der alkalischen Hydrolyse durch spezifische HCO_3H-Spaltung ergab im wesentlichen die gleichen Fettsäureverhältnisse. Ein weiterer Kontrollversuch mit Derivatisierung ohne vorangehende Verseifung bewies die Abwesenheit freier Fettsäuren.

In Tab.4o sind die Daten einiger Gaschromatogramme der so aus den gereinigten LCFA-CoA-Fraktionen erhaltenen, in n-Heptan aufgenommenen Fettsäuremethylestergemische aufgeführt; außerdem Gaschromatogramme der methylierten FFA aus Schweineleberlyophilisat (durch Aceton- und Petrolätherextraktion erhalten und ohne Verseifung derivatisiert) sowie einiger Eichgemische. Es sind die vom Integrator ausgedruckten R_T-Werte (Retentionszeiten) für verschiedene Temperaturprogramme sowie die nach der elektronischen Integration des gesamten Chromatogramms ausgedruckten Prozentwerte für die aufgrund der R_T-Werte identifizierten Gipfel angegeben, nicht jedoch die absoluten Flächen, da es hier nur auf das Verhältnis der Fettsäurereste zueinander ankam.

Für die Bezeichnung der Fettsäurereste wählten wir die Klenk'sche Notation n:xwy, wobei:

n ≙ Zahl der C-Atome, Kettenlänge

x ≙ Zahl der Doppelbindungen

y ≙ Zahl der C-Atome zwischen Methylende und Mitte der dem Methylende am nächsten liegenden Doppelbindung.

Abgesehen von selten vorkommenden und daher hier nicht besprochenen ungewöhnlichen Fettsäuren, die besonders in Fischen, Pflanzen und Bakterien gefunden wurden und die z.B.Verzweigungen, trans-Doppelbindungen, konjugierte Doppelbindungen, Dreifachbindungen, Hydroxy-

Tab.4o: Identifizierung und Quantifizierung der Fettsäuremethylester mittels Gaschromatographie

Nr.4: Eichmischung
Nr.6: LCFA-CoAs aus Schweineleber
Nr.11: FFA aus Schweineleber
Nr.14: LCFA-CoAs aus Schweineleber
Nr.15: LCFA-CoAs aus Schweineleber
Nr.16: Eichmischung
Nr.24: Eichmischung
Nr.28: LCFA-CoAs aus Rattenleber (Tier 4; Hunger)
Nr.29: LCFA-CoAs aus Rattenleber (Tier 1; Futter)
Nr.3o: Eichmischung
Nr.32: Eichmischung
Nr.33: FFA aus Schweineleber
Nr.34: Eichmischung
Nr.35: LCFA-CoAs aus Hefe
Nr.38: LCFA-CoAs aus Rattenleber (Tier 5; Hunger)
Nr.39: LCFA-CoAs aus Rattenleber (Tier 2; Futter)

Temperaturprogramm: 1oo-22o°C; 4°/min
" "
12o-22o°C; "
" "
" "
" "
13o-22o°C; "
" "
" "
" "
" "
" "
" "
" "
" "
" "

sh = Schulter, tr = Spurenkomponente
Weitere Angaben im Text

Nr.		14:o	15:o	16:o	16:1w7	17:o	18:o	18:1w9	18:2w6	18:3w3	2o:o	2o:1w9	2o:2w6	x	2o:4w6 +2o:3w3	22:o	22:6w3
4	R_T	-	-	15,25	15,89	-	19,47	19,87	2o,9o	22,5o	-	-	-	-	26,o7	-	31,53
6	R_T	+	14,1o	15,62	-	18,o1	19,66	-	-	-	-	-	-	24,9o	26,4o	-	-
	%	tr	tr	25,52	-	2,13	67,62	-	-	-	-	-	-	3,6o	1,13	-	-
11	R_T	8,6o	1o,3o	11,67	-	13,97	15,6o	15,96	17,o7	-	-	-	-	2o,75	22,o8	-	27,46
	%	o,64	o,22	29,62	-	1,68	39,88	19,98	1,o5	-	-	-	-	2,o3	1,42	-	1,97
14	R_T	8,35	9,91	11,29	sh	13,39	14,89	-	-	-	-	-	-	2o,o1	21,51	-	-
	%	o,21	o,17	24,o4	tr	1,89	65,o6	-	-	-	-	-	-	3,43	1,22	-	-
15	R_T	8,44	1o,o3	11,43	-	13,54	14,98	-	-	-	-	-	-	2o,22	21,56	-	-
	%	o,17	o,22	24,58	-	1,8o	67,33	-	-	-	-	-	-	2,79	tr	-	-
16	R_T	-	-	11,16	11,75	-	14,99	15,41	16,49	18,o2	-	-	-	-	21,52	-	26,77

Tab.4o: Fortsetzung von S.175

Nr.	14:o	15:o	16:o	16:1w7	17:o	18:o	18:1w9	18:2w6	18:3w3	2o:o	2o:1w9	2o:2w6	x	2o:4w6 +2o:3w3	22:o	22:6w3
24 R_T	6,42	-	9,68	1o,22	11,34	13,24	13,6o	14,69	16,16	16,76	-	-	-	19,6o	2o,37	25,11
28 R_T	6,8o	-	9,89	-	11,75	13,32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
%	o,52	-	6,47	-	o,14	9,65	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
29 R_T	6,84	8,38	9,82	sh	11,8o	13,29	sh	14,74	-	-	-	-	18,24	-	-	-
%	1,39	o,82	23,69	tr	o,81	41,86	tr	o,83	-	-	-	-	4,18	-	-	-
3o R_T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	17,29	18,33	-	19,58	-	-
32 R_T	6,37	-	9,51	1o,o3	11,14	13,o6	13,39	14,47	15,94	16,68	-	-	-	19,5o	2o,16	24,76
33 R_T	6,68	8,17	9,4o	-	11,5o	13,1o	13,44	sh	-	-	-	-	18,o4	19,44	-	24,47
%	o,84	o,22	31,26	-	1,73	43,68	15,84	tr	-	-	-	-	2,o5	1,o6	-	2,oo
34 R_T	6,3o	7,81	-	-	11,37	-	-	-	-	16,73	-	-	-	-	2o,4o	-
35 R_T	-	-	1o,13	-	-	13,63	-	-	-	-	-	-	18,33	-	-	-
%	-	-	16,98	-	-	22,81	-	-	-	-	-	-	11,o3	-	-	-
38 R_T	-	-	1o,27	-	-	13,81	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
%	-	-	19,56	-	-	3o,86	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
39 R_T	-	-	1o,12	-	12,o9	13,59	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
%	-	-	18,35	-	o,82	33,65	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

und Ketogruppen enthalten können, sind die natürlich vorkommenden Fettsäuren unverzweigt und haben außer der Carboxylgruppe keine funktionellen Gruppen. Die ungesättigten Fettsäuren besitzen ausschließlich isolierte cis-Doppelbindungen, die im Polyallylrhythmus angeordnet sind, d.h.durch je eine Methylengruppe voneinander getrennt sind. Unter diesen Voraussetzungen ist die Klenk'sche Notation auch für mehrfach ungesättigte Säuren eindeutig und anderen Nomenklaturen wegen ihrer Kürze vorzuziehen. Außerdem zeigt diese Bezeichnungsweise biochemische Zusammenhänge zwischen verschiedenen Fettsäuren auf, da sie deren Einreihung in vier Hauptgruppen ermöglicht, die sich durch den y-Wert unterscheiden und zwischen denen im tierischen Organismus keine Übergänge möglich sind (s.5.3.2.).

Die Identifizierung der Fettsäuremethylester erfolgte ausschließlich durch Vergleich der R_T-Werte mit denen authentischer Vergleichssubstanzen. Bei konstanter Temperatur ist zusätzlich noch eine graphische Identifizierung auf Grund einer halblogarithmischen Darstellung möglich: Der Logarithmus der auf Stearinsäure (18:o) bezogenen relativen Retentionszeit wird gegen die Kettenlänge aufgetragen; Fettsäuremethylester mit gleichem x und y liegen dann auf parallelen Geraden. Da wir, um kürzer- und längerkettige Säuren in vertretbarer Zeit gleichermaßen erfassen zu können, die Temperatur kontinuierlich erhöhen mußten, erhielten wir bei entsprechender Auftragung lediglich gleichlaufende gekrümmte Kurven, deren Auswertung sich als zu ungenau erwies.

Im Bereich der C_{16}- und der C_{18}-Säuren trat in den meisten Fällen - außer bei den FFA aus Schweineleber, bei denen 18:o und 18:1w9 getrennt wurden - nur je ein Gipfel auf, der allenfalls eine schwache Schulter aufwies, die aber nicht mit integriert wurde. Die Zuordnung dieser Gipfel zu der gesättigten oder ungesättigten Verbindung war wegen der geringen Unterschiede in den Retentionszeiten oftmals schwierig, gelang aber in den meisten Fällen durch Inter- oder Extrapolation der R_T-Werte der übrigen Gipfel. Da diese im Chromatogramm Nr.35 (Hefe) weitgehend fehlten, ist die Zuordnung in diesem Fall noch unsicher, so daß die für 16:o und 18:o angegebenen Werte evtl. tatsächlich für 16:1w7 und 18:1w9 gelten. In den übrigen Fällen handelt es sich anscheinend immer um die gesättigte Verbindung (16:o und 18:o). 16:1w7 (Palmit-

oleinsäure) ist wohl nur in Spuren vorhanden, 18:1w9 (Ölsäure) nur in einem geringen Ausmaß. In Eichmischungen und bei der Charakterisierung der FFA aus Schweineleberlyophilisat konnten 16:o und 16:1w7 sowie 18:o und 18:1w9 ohne weiteres voneinander getrennt werden, so daß ein größerer Anteil der ungesättigten Verbindung bei den LCFA-CoAs wohl auf jeden Fall hätte erkannt werden müssen.

Sowohl bei Hefe als auch bei einigen Rattenleberpräparaten wurden nicht-identifizierbare "Geistergipfel" erhalten, nicht aber bei Schweineleber. Sie sind in Tab.4o weggelassen worden; ihre Retentionszeiten liegen im Bereich der C_{22}- und C_{24}-Säuremethylester. Nach (173) kann es sich bei diesen Artefakten um nicht methylierte Fettsäuren handeln, die sich auf polaren und unpolaren Säulen durch lange Retentionszeiten auszeichnen. Der in Tab.4o mit x bezeichnete Gipfel hat eine ähnliche Retentionszeit wie der Methylester von 2o:2w6; auf Grund biochemischer Überlegungen glauben wir jedoch, daß es sich um 2o:3w9 handelt (s.5.3.2.). Wir hatten allerdings keine authentische Vergleichssubstanz zur Verfügung; auch ist wegen des Auftauchens eines entsprechenden Gipfels in den Chromatogrammen 29 (Ratte) und 35 (Hefe) Artefaktbildung nicht völlig auszuschließen. Der x-Gipfel trat nämlich nur bei einer Rattenleber (Tier 1; gefüttert) auf, nicht jedoch bei dem gleich behandelten Tier 2 sowie bei den fastenden Ratten 4 und 5. Bei Hefe wiederum gibt es keinen physiologischen Grund für das Auftreten von C_{2o}-Fettsäuren, da dieser das Elongationssystem fehlt.

Manche Fettsäuremethylester-Paare lassen sich auf gepackten Gaschromatographie-Säulen überhaupt nicht voneinander trennen. Wie in Tab.4o bereits angegeben, haben 2o:4w6 und 2o:3w3 die gleiche Retentionszeit (173). 2o:3w3 ist aber bisher fast nur in Fischölen gefunden worden, so daß man davon ausgehen kann, daß es sich bei einem Gipfel an dieser Stelle um 2o:4w6 (Arachidonsäure) handelt. Nach (173) werden auch 18:1w9 (Ölsäure) und 18:1w7 (Vaccensäure) zur selben Zeit eluiert; jedoch kommt 18:1w7 in pflanzlichen und tierischen Organen nur in geringen Mengen vor.

Die in Tab.4o angegebenen Prozentwerte sind nicht ohne weiteres vergleichbar und teilweise irreführend, da der Integrator automatisch sämtliche bis zum Abschalten erhaltenen Gipfel addiert

und den Anteil der einzelnen Gipfel an dieser Summe berechnet. Es besteht also eine Abhängigkeit vom Zeitpunkt des Ausschaltens, vom sog."Reject", d.h.der Schwelle, die ein bestimmter Gipfel überschreiten muß, damit er integriert wird, von der Basislinie, die bei höheren Temperaturen (etwa ab 180°C) ansteigt und unruhig wird, so daß zahlreiche kleine Scheingipfel mitintegriert werden, die keinem Methylester entsprechen, und schließlich von den "Geistergipfeln", die ausschließlich bei hohen Temperaturen und langen Retentionszeiten auftreten. Da es uns nur auf das Verhältnis der identifizierten Fettsäurereste zueinander ankam, war es günstig, einen Bezugsgipfel zu wählen, der in allen Chromatogrammen vorkam, einwandfrei identifiziert werden konnte und möglichst nur eine Verbindung enthielt. Wir wählten dafür Palmitinsäure (16:o) und setzten die Fläche des ihrem Methylester entsprechenden Gipfels gleich 1oo. Die auf diese Weise für die anderen Fettsäurereste erhaltenen relativen Werte sind in Tab.41 aufgeführt; sie sind tatsächlich sehr konstant und reproduzierbar.

Sowohl bei den in Tab.4o angegebenen Prozentwerten als auch bei den in Tab.41 aufgeführten, auf 16:o bezogenen Werten handelt es sich um Gewichtsverhältnisse; auf eine Umrechnung in Molverhältnisse verzichteten wir wegen der relativ geringen Molekulargewichtsunterschiede. Nach (173) hätten auch die Gewichtsverhältnisse noch geringfügig korrigiert werden sollen, da die Empfindlichkeit des Flammenionisationsdetektors proportional zur Zahl der keine Carbonylfunktion tragenden C-Atome (bei Methylestern also proportional zu n) ansteigt, so daß die höheren Fettsäuren relativ zu stark berücksichtigt werden. Eine noch geringfügigere Korrektur ist für die Zahl x der Doppelbindungen möglich. Wegen des geringen zusätzlichen Informationsgehaltes der korrigierten Werte verzichteten wir auf diese Korrekturen.

b) Literaturangaben zur Fettsäurezusammensetzung

Ähnlich wie die Lipidzusammensetzung (s.6.5.), so weist auch die Fettsäurezusammensetzung Spezies-, Organ- und Organellanomalitäten auf. Escherichia coli enthält z.B. als einzige ungesättigte Säuren 16:1w7 und 18:1w7. Die Fettsäurezusammensetzung von Candida tropicalis kann durch Zugabe von verschiedenen Alkanen, die von Mycoplasma laidlawii durch Zugabe von verschiedenen Fettsäuren

Nr.		14:o	15:o	16:o	16:1w7	17:o	18:o	18:1w9	18:2w6	x	2o:4w6 +2o:3w3	22:6w3
6	LCFA-CoAs aus Schweineleber	tr	tr	1oo	-	8,3	265,o	-	-	14,1	4,4	-
14	LCFA-CoAs aus Schweineleber	o,9	o,7	1oo	tr	7,9	27o,6	-	-	14,3	5,1	-
15	LCFA-CoAs aus Schweineleber	o,7	o,9	1oo	-	7,3	273,9	-	-	11,4	tr	-
11	FFA aus Schweineleber	2,2	o,7	1oo	-	5,7	134,6	67,5	3,5	6,9	4,8	6,7
33	FFA aus Schweineleber	2,7	o,7	1oo	-	5,5	139,7	5o,7	tr	6,6	3,4	6,4
29	LCFA-CoAs aus Rattenleber(Futter)	5,9	3,5	1oo	tr	3,4	176,7	tr	3,5	17,6	-	-
39	LCFA-CoAs aus Rattenleber(Futter)	-	-	1oo	-	4,5	183,4	-	-	-	-	-
28	LCFA-CoAs aus Rattenleber(Hunger)	8,o	-	1oo	-	2,2	149,1	-	-	-	-	-
38	LCFA-CoAs aus Rattenleber(Hunger)	-	-	1oo	-	-	157,8	-	-	-	-	-
35	LCFA-CoAs aus Hefe	-	-	1oo	-	-	134,3	-	-	65,o	-	-

Tab.41: Charakterisierung der Acylreste in LCFA-CoAs aus verschiedenen biologischen Materialien
Bezugsgröße: Palmitylrest (16:o) ≙ 1oo
tr = Spurenkomponente
Weitere Angaben im Text

zum Kulturmedium stark variiert werden. In diesem Zusammenhang sollen nur Literaturwerte für die von uns untersuchten Materialien Hefe sowie Schweine- und Rattenleber angegeben werden (41,174) (s.Tab.42).

Die Gesamtfettsäuren von Saccharomyces cerevisiae bestehen zum größten Teil aus 16:1w7 und 18:1w9, daher rühren auch die Zweifel an der korrekten Zuordnung in Chromatogramm Nr.35 (Tab.4o). Für Rattenleber sind die Fettsäuremuster von FFA, Triglyceriden und verschiedenen Phospholipiden angegeben (PC, PE, PI, PS, DPG, PA, SM), für Schweineleber die Fettsäurezusammensetzung von Triglyceriden und PC. In Schweineleber ist weniger 16:o, dafür mehr 18:3w3 und 2o:3w9 als in Rattenleber enthalten; für sie ist außerdem das verstärkte Auftreten ungeradzahliger Fettsäuren (15:o, 17:o, 17:1) charakteristisch. Nicht nur die prozentualen Werte, auch die Verhältnisse der C_{18}- zu den C_{16}-Säuren, die ausgerechnet wurden, um einen besseren Vergleich mit Tab.41 zu ermöglichen, schwanken sehr stark. Die Extremwerte sind $(C_{18}/C_{16})x1oo = 74$ bei SM und = 1343 bei DPG. Der Faktor bei Hefe liegt wie der von uns für LCFA-CoAs gefundene nahe bei 1oo. Der relative Anteil an gesättigten und ungesättigten Fettsäuren in Phospholipiden hat entscheidende Bedeutung für die Membraneigenschaften; so bildet etwa Distearyl-PC eine fast undurchlässige Barriere, Dioleyl-PC dagegen eine sehr durchlässige Membran.

Es sind nicht nur die Gesamtfettsäurezusammensetzungen in den einzelnen Lipidspezies, sondern auch für die einzelnen Stellungen innerhalb des Moleküls untersucht worden (in Tab.42 nicht aufgeführt). Im allgemeinen ist die 1-Position des Glycerins mit einer gesättigten, die 2-Position mit einer ungesättigten Säure besetzt, was auf die unterschiedlichen Acyldonatorspezifitäten der beteiligten Acyltransferasen zurückzuführen ist (42 bis 45) (vgl.Kapitel 1.). Auch hier gibt es jedoch Ausnahmen; so ist nach (175) die sn-2-Position in Triglyceriden des Schweines bevorzugt mit 16:o besetzt, die 1- und 3-Position mit 18:1w9.

Die bisher einzige in der Literatur beschriebene Fettsäurezusammensetzung von LCFA-CoAs ist die von W.M.Bortz und F.Lynen (17) in der Leber von gefasteten Ratten gefundene. Aus der dort

Tab.42: Fettsäurezusammensetzungen nach (41), (174) und (17)
weitere in der Tabelle nicht aufgeführte Fettsäuren:
[a] 12:o [b] 17:1 [c] 2o:5, 22:5 [d] 2o:1, 2o:5, 22:5 [e] 2o:o, 22:o, 23:o, 24:o, 24:1
[f] 16:2, 21:o

		14:o	15:o	16:o	16:1w7	17:o	18:o	18:1w9	18:2w6	18:3w3	2o:3w9	2o:4w6	22:6w3	C_{16}	C_{18}	$\frac{C_{16}}{C_{18}} \times 100$
S.cerevisiae	Gesamtfettsäuren[a]	1,o	-	12,5	37,o	-	5,o	43,9	-	tr	-	-	-	49,5	48,9	98,8
Schweineleber	TG[b]	1,4	o,6	17,7	7,1	2,5	5,o	56,6	o,7	1,7	2,2	o,2	-	24,8	62,3	251,2
	PC[c]	-	-	24,8	1,3	-	28,8	14,7	13,3	tr	1,5	1o,9	1,3	26,1	56,8	217,6
Rattenleber	PC	o,5	-	29,7	1,o	-	16,8	1o,4	16,8	-	1,5	18,3	3,4	3o,7	44,o	143,3
	DPG	-	-	4,4	2,6	-	1,6	14,9	77,5	-	-	-	-	7,o	94,o	1342,9
	PA	-	-	32,8	-	-	14,8	23,1	21,7	-	-	6,9	-	32,8	59,6	181,7
	PE[d]	-	-	25	2	-	14	6	6	-	-	1o	2o,5	27	26	96,3
	PI	tr	-	11	2	-	59	6	3	-	1	27	-	13	68	523,1
	PS	o,9	-	22,8	2,2	-	15,3	15,o	3o,9	-	o,8	7,6	2,o	25,o	61,2	244,8
	SM[e]	-	-	21,6	o,6	-	9,9	4,1	2,4	-	-	-	-	22,2	16,4	73,9
	TG[b]	1,1	-	27,7	9,8	-	2,3	56,o	o,5	-	1,5	-	-	37,5	58,8	156,8
	FFA[f]	o,5	-	15,2	2,7	-	11,4	14,3	24,7	1,4	1,1	24,1	-	18,5	51,8	28o,o
	LCFA-CoA[a]	o,5	o,2	2o,o	2,o	-	26,o	8,o	1o,o	o,1	-	35,o	-	22,o	44,o	2oo,o

angegebenen Aufarbeitungsvorschrift läßt sich schließen, daß außer LCFA-CoAs noch alle möglichen Phospholipide mitgemessen wurden; eine Reinheitsprüfung erfolgte nicht. Wegen der ähnlichen Fettsäurezusammensetzung der meisten Phospholipide, insbesondere des PC, das etwa 5o % aller Phospholipide ausmacht (s.6.5.), wurden jedoch einigermaßen vergleichbare Werte erhalten. Es ist allerdings nicht einzusehen, daß 15:o gefunden wurde und 17:o nicht, obwohl letzteres doch unter den ungeradzahligen Säuren das Hauptprodukt darstellen soll (s.5.3.2.). Der äußerst hohe und daher von vornherein unwahrscheinliche Wert von 35,o % für 2o:4w6 ist mit Sicherheit ein Artefakt; die Aufarbeitung erfolgte mit Diäthyläther, der, wie schon beschrieben, häufig zu "Geistergipfeln" führt.

5.3.2. Diskussion der gefundenen Fettsäurezusammensetzung

a) Geradzahlige gesättigte Fettsäuren

Seit längerem ist bekannt, daß die Hauptprodukte der Fettsäuresynthetase aus Hefe Palmityl- und Stearyl-CoA sind (18). Ähnliches gilt für das aus Rattenleber gewonnene Enzym, nur daß hier die freien Fettsäuren entstehen. M.Sumper und D.Oesterhelt stellten für das Hefeenzym ein Kettenabbruchmodell auf, das die Produktverteilung bei der Fettsäuresynthetase-Reaktion erklärt und für verschiedene Situationen vorhersagen kann (176). Bei einem Verhältnis Malonyl-CoA/Acetyl-CoA = 2:1 im Standardansatz der Fettsäuresynthese ergibt sich ein Produktgemisch aus ca.5o % Stearyl- und 4o % Palmityl-CoA, d.h. $\frac{18:o}{16:o}$ x 1oo = 125. Wir erhielten in guter Übereinstimmung mit der Theorie bei Hefe einen Wert von 134 (s.Tab.41); dies bedeutet, daß die Fettsäuresynthese ungestört ablaufen kann. Die Werte für Ratten- und Schweineleber liegen höher; dies liegt wahrscheinlich an quantitativ anderen Eigenschaften des tierischen Enzyms - es müssen andere Konstanten in die von Sumper angegebene Formel eingesetzt werden - sowie an unterschiedlichen Konzentrationen für Acetyl- und Malonyl-CoA.

Setzt man nur Acetyl-CoA und kein Malonyl-CoA als Starter ein, so kann man die Fettsäuresynthese durch Zugabe verschiedener Mengen Acetyl-CoA-Carboxylase regulieren. Bei geringerer Acetyl-CoA-Carboxylase-Menge oder -Aktivität sinkt das Malonyl-CoA/

Acetyl-CoA-Verhältnis; mit dem Sumper'schen Kettenabbruchmodell errechnet sich ein höherer Anteil der kürzerkettigen Acyl-CoA-Verbindungen im Produktgemisch, so daß der Quotient $\frac{18:o}{16:o}$ kleiner wird.

In der Leber gehungerter Ratten ist die Acetyl-CoA-Carboxylase-Aktivität auf Grund der gestiegenen LCFA-CoA-Konzentration geringer (s.Kapitel 1.), so daß ebenfalls ein Absinken des $\frac{18:o}{16:o}$ - Verhältnisses erwartet wird. Tatsächlich beobachteten wir eine geringfügige, aber signifikante Abnahme von 18o auf ca.15o (s.Tab.41).

b) Ungeradzahlige gesättigte Fettsäuren

Stellt man analoge Überlegungen für die Produktverteilung mit Propionyl-CoA als Starter an, so erhält man Margarinsäure (17:o) fast als einziges Produkt (176). In sehr geringem Umfang werden auch 15:o und 19:o erhalten. Wegen der unruhigen Basislinie ab 18:o konnten wir nur 15:o entdecken. Entsprechend der Voraussage betrug sein Anteil ca. 1/1o des 17:o-Anteils.

Das für die Bildung von Fettsäuren mit einer ungeraden Anzahl von C-Atomen notwendige Propionyl-CoA kann nicht nur durch Abbau ungeradzahliger oder verzweigter Fettsäuren entstehen, sondern bildet sich auch beim Abbau der Aminosäuren Isoleucin, Methionin und Threonin sowie bei der Bildung von Gallensäuren aus Steroiden durch Verkürzung der verzweigten Seitenkette.

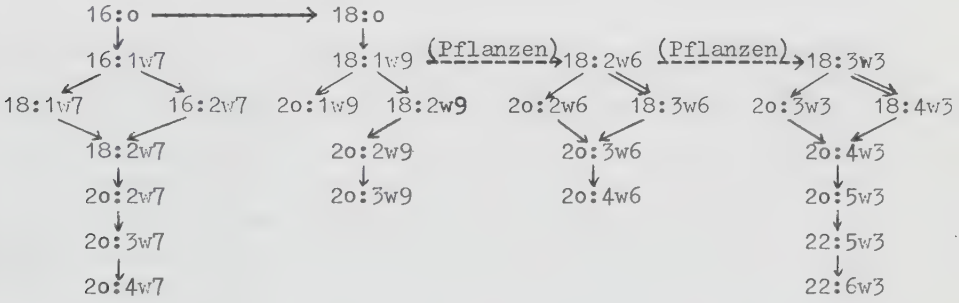
c) Einfach ungesättigte Fettsäuren

Die einzigen in Hefe und im tierischen Organismus de novo synthetisierten einfach ungesättigten Fettsäuren sind 16:1w7 und 18:1w9. Die von Bloomfield und Bloch aus Hefe isolierte "Desaturase" führt die cis-Doppelbindung stellungsspezifisch zwischen die C-Atome 9 und 1o der gesättigten LCFA-CoA-Thiolester PCoA und Stearyl-CoA ein, unabhängig von der Kettenlänge (177). Analog den von mischfunktionellen Oxigenasen katalysierten Reaktionen sind NADPH und molekularer O_2 erforderlich. Freie Fettsäuren werden nicht umgesetzt, von manchen in Pflanzen und Mikroorganismen gefundenen Desaturasen hingegen "acyl carrier protein"-Derivate oder in komplexen Lipiden gebundene Fettsäuren.

Da 16:1w7 und 18:1w9 unmittelbar aus ihren von der Fettsäuresynthetase gebildeten Vorstufen 16:o und 18:o entstehen, muß die Summe aller C_{16}- bzw. C_{18}-Säuren für den Vergleich mit der theoretischen Produktverteilung berücksichtigt werden. Dies ist in den obigen Vergleichen (Tab.41 und 42) bereits geschehen.

d) Mehrfach ungesättigte Fettsäuren

In folgendem Schema ist die Bildung von mehrfach ungesättigten Fettsäuren aus den einfach ungesättigten Fettsäuren dargestellt. Nach der Klenk'schen Notation lassen sich alle natürlich vorkommenden ungesättigten Fettsäuren in 4 Hauptreihen einteilen:
die w7- oder Palmitoleinsäure-Reihe,
die w9- oder Ölsäure-Reihe,
die w6- oder Linolsäure-Reihe und
die w3- oder α-Linolensäure-Reihe.



Wie aus dem Schema ersichtlich, stehen Elongation und Desaturierung in Konkurrenz miteinander. Die Elongation ist um so mehr begünstigt, je kürzer die Kette und je größer die Zahl der Doppelbindungen ist. Die Grundverbindungen der w9-, der w6- und der w3-Reihe werden vorzugsweise zunächst desaturiert, bevor eine Kettenverlängerung erfolgt.

Das obige Reaktionsschema läuft in der Mikrosomenfraktion ab und zwar an den CoA-Estern der Fettsäuren. Die Kettenverlängerung erfolgt an einem auf dem endoplasmatischen Reticulum lokalisierten Lipoproteinsystem mit Hilfe von Malonyl-CoA-Einheiten und NADPH (178), analog zur Fettsäuresynthetase-Reaktion; in Mitochondrien existiert außerdem ein mit Acetyl-CoA und NADH arbeitendes System

(179), das allerdings sein Aktivitätsmaximum bei kürzeren Kettenlängen hat (n = 6). Die Desaturierung läuft wie die Einführung der ersten Doppelbindung ab und benötigt daher NADPH und O_2. Im Gegensatz zur primären Olefinierungsreaktion wird die Stellung der neu eingeführten Doppelbindung durch die schon im Molekül vorhandenen Doppelbindungen bestimmt.

Tierische Desaturasen können nur im Carboxylende neue Doppelbindungen einführen. Daher sind im tierischen Organismus keine Übergänge zwischen den verschiedenen w-Reihen möglich. Ohne Aufnahme einer w6- oder einer w3-Säure aus pflanzlicher Nahrung können also nur w7- und w9-Säuren gebildet werden. Die Grundverbindungen der w3- und der w6-Reihe, α-Linolen- und Linolsäure, sowie 2o:4w6 (Arachidonsäure), werden als essentielle Fettsäuren bezeichnet. Besonders w6-Säuren sind für den Säugetierorganismus unentbehrlich, da aus ihnen (besonders aus 2o:4w6) Prostaglandine gebildet werden.

Das Elongations-Desaturierungs-System ist ziemlich unspezifisch und setzt alle oben genannten Säuren mit mehr oder weniger großer Geschwindigkeit um, so daß die Säuren einer Reihe die Umsetzung von Säuren einer anderen Reihe kompetitiv inhibieren können. Bei Defizienz an essentiellen Fettsäuren können w6-Säuren die Elongation und Desaturierung der endogen vorhandenen Ölsäure 18:1w9 nicht länger kompetitiv inhibieren, so daß das w9-Umsetzungsschema abläuft. 2o:3w9 kann nicht weiter umgesetzt werden: Weitere Desaturierung zu 2o:4w9 würde verbotenermaßen eine zur Carboxylfunktion konjugierte Doppelbindung liefern; andererseits ist die Zahl der Doppelbindungen für eine rasche Elongation zu 22:3w9 noch zu klein. 2o:3w9 häuft sich also an, so daß der Quotient $\frac{2o:3w9}{2o:4w6}$ in Plasma- oder Gewebelipiden als Indicator des Mangels an essentiellen Fettsäuren gilt: Von Essentielle-Fettsäuren-Defizienz wird gesprochen, wenn der Quotient $> 0{,}4$ ist.

Aus diesem Grunde glauben wir, daß es sich bei der Verbindung x in Tab.40 und 41 um 2o:3w9 handelt, obwohl wir keine Vergleichsverbindung zur Verfügung hatten; auch ist in der Literatur für Schweineleber ein besonders hoher Gehalt für 2o:3w9 angegeben. Die beiden anderen in Frage kommenden Verbindungen 2o:2w6 und 2o:3w6 können sich nach obigem Schema kaum anhäufen.

Als letztes Glied der w3-Reihe kann schließlich noch 22:6w3 akkumulieren; diese Säure fanden wir allerdings nur in der FFA-Fraktion aus Schweineleber-Lyophilisat.

6. Experimenteller Teil

6.1. Allgemeines

6.1.1. Verwendete Geräte

Flüssigkeits-Szintillationszähler, Isocap/300 (Nuclear Chicago)
Dünnschicht-Scanner, II LB 2723 (Berthold)
Präparative Zentrifuge (W.Stock Maschinenbau KG)
Automatic Superspeed Centrifuge RC-2, RC-2B und RC-5 (Sorvall)
Präparative Ultrazentrifugen, Modelle L und L 3-40 (Beckman)
Tischzentrifugen Typ UJ 0 und UJ 1 (Christ)
Zellhomogenisator (Manton-Gaulin Manuf.Co.)
Homogenisator "Zauberstab" (ESGE)
Rührmotor (Heidolph)
Magnetrührer (Colora, Janke und Kunkel, Heidolph)
Mixer "REAX I" (Heidolph) und "Ultraturrax" (Janke und Kunkel)
Whirlimix (Cenco)
automatische Warburgapparatur (MPI für Biochemie, Martinsried)
Gaschromatograph "5750 Research Chromatograph + 3380 Integrator" (Hewlett-Packard) (MPI für Psychiatrie, München)
Sonifier Modell 3000 (MSE) und Sonic Power S 75 (Branson)
Photometer "Eppendorf" mit Transformationsstufe 1852 (Netheler & Hinz) und Kompensograph PR 2210 U/00 (Philips)
Spektralphotometer M 4 Q II mit T/E-Wandler (Zeiss)
UV-Spektralphotometer Modell DK-1 (Beckman)
Fraktionskollektor UltroRac (LKB)
Schlauchpumpen Perpex (LKB)
Durchflußphotometer Uvicord II mit Sechskanal-Punktschreiber (LKB)
pH-Meter Typ pH 27 (Knick)
Glaselektroden (Ingold)
Rotationsverdampfer "Rotavapor R" (Büchi)
Analysenwaagen, Modelle H 20 T, P5 und P 1210 (Mettler)
Gefriertrockner L 05 (WKF)
UV-Lampe Typ TL 900 (Camag)
Brutschrank, Trockenschränke (Heraeus)
Wasserbäder (Labora, Haake)
Mikroliterspritzen (Hamilton)
Mikroliterpipetten "Eppendorf", "Finn", "Gilson"
sonstige übliche Kleingeräte

6.1.2. Materialien

1-^{14}C-Palmitinsäure, 9,1o-^{3}H-Palmitinsäure, 1-^{14}C-Stearinsäure, 1-^{14}C-Laurinsäure (Amersham-Buchler, Braunschweig)
Phosphotransacetylase, Malat-Dehydrogenase, Citratsynthase, Alkohol-Dehydrogenase, saure Phosphatase, Phospholipase C, NAD, NADPH, CoA, Acetylphosphat, ATP (Boehringer, Mannheim)
BSA (Behringwerke, Marburg)
DTT, DTE (Calbiochem, San Diego)
DTNB, N-Äthylmaleinimid, Triäthanolamin, Laurin-, Myristin-, Arachidinsäuremethylester (Fluka, Buchs)
PPO, POPOP, Dimethyl-POPOP, Unisolve I (Koch & Light, Colnbrook)
Stickstoff, Methan, flüssiger Stickstoff (Linde, Lohhof)
Sephadex G-25 und G-5o (Pharmacia, Uppsala)
KH_2AsO_4 (Riedel-de Haen, Seelze-Hannover)
Tripalmitin, PC, Öl-, Linolsäuremethylester (Roth, Karlsruhe)
Polygram-Dünnschichtfolien (Macherey-Nagel, Düren)
PC, PI, PE, PS, PG, DPG, alle nicht an anderer Stelle aufgeführten Fettsäuremethylester (Sigma-Chemie, Taufkirchen)
PA, Triton X-1oo, Cellophan-Dialyseschlauch (Serva, Heidelberg)
DEAE-Cellulose, Chromatographiepapier Nr.1 und 3MM (Whatman, Maidstone)
Aluminiumoxid, basisch und neutral (ICN-Woelm, Eschwege)

Für verschiedene Zwecke verwendete Lösungsmittel wurden in technischer Reinheit von der Firma Biesterfeld, Feldkirchen bezogen, nach (18o) gereinigt und ggf. absolutiert.

Für chromatographische Zwecke verwendete Lösungsmittel stammten von Merck, Darmstadt und wurden unverändert eingesetzt. Tetrahydrofuran für die LCFA-CoA-Synthese nach (8o) stammte ebenfalls von Merck; es wurde über KOH-Plätzchen aufbewahrt und unmittelbar vor Gebrauch über $LiAlH_4$ destilliert.

N,S-Diacetylcysteamin war ein Geschenk von Dr.G.-B.Kresze; Margarin- und Behensäuremethylester wurden mir freundlicherweise von Dr.W.Schäfer zur Verfügung gestellt.

Alle übrigen Chemikalien und Dünnschichtmaterialien stammten von der Firma Merck, Darmstadt und besaßen die höchste erhältliche Reinheitsstufe.

Bäckerhefe: DHW, Nürnberg, bezogen über Hefe-Mayr, München
Schweineleber: Firma Südfleisch, Schlachthof München
Rattenleber: Die Ratten (♂ Whistar) wurden vom MPI für Biochemie, Martinsried sowie vom Institut für Pharmazie der Universität München bezogen und selbst geschlachtet.

6.1.3. Allgemeine analytische Methoden

a) Proteinbestimmung

Wir bestimmten Protein mit der Biuretmethode nach (181) sowie mit dem modifizierten Lowry-Test nach (182,183). Bei Enzymanreicherungen und in Säuleneluaten bestimmten wir die Proteinkonzentration durch Messung der Extinktionen bei 26o nm und 28o nm nach (184); die Berechnung erfolgte hierbei nach der Näherungsformel von (185):

(XXVIII) Proteinkonzentration (mg/ml) = 1,55 E_{28o} - o,76 E_{26o}

b) Radioaktivitätsbestimmung

Zur Radioaktivitätsbestimmung wurden unter anderem folgende Szintillations-Zählflüssigkeiten benutzt:

I. 5o mg 1,4-Bis-2-(5-phenyloxazolyl-)benzol (POPOP)
+ 4 g 2,5-Diphenyloxazol (PPO)
+ Toluol ad 1 l

II. 5oo mg 1,4-Bis-2-(4-methyl-5-phenyloxazolyl-)benzol (Dimethyl-POPOP)
+ 5 g PPO
+ Toluol ad 1 l

III. 6o g Naphthalin
+ 2oo mg POPOP
+ 4 g PPO
+ 1oo ml Methanol
+ 2o ml Glycol
+ Dioxan ad 1 l (nach Bray)

ferner käufliche Szintillationscocktails, insbesondere Unisolve 1 und Quickszint 4o2.

Die Radioaktivität von Lösungen wurde entweder durch einfaches Zupipettieren zur Zählflüssigkeit (also in homogener Lösung) oder durch Auftragung von Aliquoten auf Whatman 1-Filterpapierstreifen bestimmt, die dann unter Infrarotlampen oder mit dem Fön getrocknet und ebenfalls im Szintillationscocktail gezählt wurden. Radioaktiv markierte Palmitinsäure läßt sich in allen Cocktails in homogener Lösung messen, PCoA nur in Zählflüssigkeit III sowie in Unisolve 1 und Quickszint 4o2, zu denen in begrenztem Maß auch Wasser zugefügt werden kann, ohne daß Phasentrennung auftritt (Wiederfindung 71 bis 73 %).

Gezählt wurde normalerweise in einem Szintillationszähler des Typs "Isocap", der es durch Ausdruck der in zwei geeichten Kanälen gezählten Impulse ermöglichte, die Zählausbeute für jede Probe an Hand einer Eichkurve zu bestimmen. In Abwesenheit quenchender Stoffe wurde in Cocktail II und in Unisolve 1 für ^{14}C eine mittlere Zählausbeute von 76 % bestimmt, in Quickszint 4o2 für ^{14}C 68 % und für ^{3}H 22 %.

Die einzelnen Punkte der Eichkurve wurden durch sukzessive Zugabe von quenchenden Stoffen (Wasser, Essigester, Hefe-E2-Extrakt, Aceton) zu homogenen Lösungen von radioaktiv markierter Palmitinsäure in einer der oben erwähnten Szintillationslösungen bzw. von radioaktiv markiertem PCoA oder ^{14}C-Uridin in Szintillationslösung III, Unisolve 1 oder Quickszint 4o2 erhalten. In Quickszint quencht Aceton besonders stark. In homogener Lösung kann die Zählausbeute außerdem durch Zufügen einer bekannten Menge markierter Palmitinsäure und durch Messen der Ipm-Differenz bestimmt werden; dieses Verfahren läßt sich jedoch nicht anwenden, wenn radioaktives PCoA auf Papier oder Glasfaser aufgetrocknet in Cocktail I oder II gemessen wird.

PCoA löst sich fast nicht in Toluol-Zählflüssigkeiten. Die von uns gemessenen ins Toluol übergegangenen 3 bis 4 % der Gesamt-Ipm (s.6.5.) müssen nicht unbedingt in Toluol gelöstes PCoA darstellen, sondern können auch von abgelösten Papier- oder Glasfaserpartikeln mit anhaftendem PCoA oder von durch Zersetzung entstandener Palmitinsäure stammen. Radioaktive Palmitinsäure wird durch einmaliges Schwenken in Zählflüssigkeit fast vollständig vom Papier abgelöst.

Schwierigkeiten bereitete besonders die Bestimmung von Radioaktivität in E2-Extrakten und $HClO_4$-Überständen. E2-Extrakte aus Hefe und anderen Materialien enthalten viele stark quenchende Bestandteile. Es wurde versucht, das Quenching durch Schwenken des Papiers in Toluol-Szintillationslösung und anschließendes Überführen in ein anderes Szintillationsgläschen mit frischem Cocktail zu beseitigen. Dies gelang jedoch nur zum Teil, da die meisten in Hefe-E2-Extrakt enthaltenden quenchenden Stoffe sich ebenfalls nicht in Toluol lösen und daher auf dem Papier bleiben.

Radioaktivität enthaltende $HClO_4$-Überstände können nicht direkt gezählt werden, da $HClO_4$ das PPO/POPOP-Szintillatorsystem zerstört. Nach Neutralisieren mit NaOH, Lyophilisieren und Waschen des Rückstandes mit Cocktail III wurden immerhin noch 87 % des eingesetzten 1-^{14}C-PCoA wiedergefunden. Wurde am Rotationsverdampfer statt am Gefriertrockner zur Trockene gebracht, so betrug die Ipm-Wiederfindung jedoch nur 21 %. Eine weitere Möglichkeit bei Bestimmung von 1-^{14}C-PCoA in $HClO_4$ war Zugabe von NaOH, Verseifung, erneutes Ansäuern mit $HClO_4$ und Ausschütteln der gebildeten 1-^{14}C-Palmitinsäure mit Petroläther; hierbei wurde eine Wiederfindung von 68 % erzielt.

Nach Abkratzen einer Kieselgel G-, Kieselgel F254- oder Cellulose F254-Schicht von einer Dünnschichtplatte fanden wir im Mittel noch 96,3 $\pm$ 3,1 % des eingesetzten 1-^{14}C-PCoA wieder (gemessen in Cocktail II). Polygramfolien für die TLC lassen sich ohne Abkratzen der Schicht, ganz analog zu den oben erwähnten Whatman 1-Papierstreifen zählen. Durch Zerschneiden einer Polygramfolie zwischen Start und Lösungsmittelfront in gleich breite Abschnitte, die beispielsweise einem ΔRf = o,1 entsprechen, läßt sich die vom Dünnschichtscanner angegebene Radioaktivitätsverteilung kontrollieren. In Abb.26 und 27 sind für 1-^{14}C- und 9,1o-^{3}H-PCoA in Laufmittel E die auf den Folienabschnitten gefundenen - aus den gemessenen Ipm über die Eichkurven bestimmten - dpm und das Dünnschichtscanner-Diagramm einander gegenübergestellt. Es besteht gute Übereinstimmung. Die dpm-Summen aller Abschnitte von Rf = o bis Rf = 1 betrugen bei dem in der Abbildung dargestellten Versuch 135,6 % bei ^{14}C und 112,3 % bei ^{3}H, die nichtkorrigierten Ipm-Summen 125,o (^{14}C) und 117,8 % (^{3}H) der eingesetzten Radioaktivität.

6.1.4. Dünnschichtchromatographie (vgl.auch 6.5.)

a) Zusammenstellung der Laufmittelsysteme:

A Petroläther:Äther:Eisessig = 9o:1o:1
B Chloroform:Methanol:Wasser = 65:25:4
C Isopropanol:Pyridin:Eisessig:Wasser = 6o:15:1:25
D Phenol:Butanol:Eisessig:Wasser = 2:2:1:1
E Butanol:Eisessig:Wasser = 5:2:3
F Isopropanol:Pyridin:Wasser = 1:1:2 (identisch mit E2)
G Isobuttersäure:Wasser:NH_3 = 66:33:1
H Isopropanol:Pyridin:Wasser = 1:1:1
I Petroläther:Äther:Eisessig = 4:5:1
J Petroläther:Äther:Eisessig = 6o:4o:1
K Chloroform:Methanol:Eisessig:Wasser = 8o:15:2:2
L Chloroform:Methanol:1o % NH_3 = 6o:35:8
M Propanol:Wasser = 7:3
N Propanol:12 N NH_3 = 4:1
O Butanol:Pyridin:Wasser = 3:2:1
P Chloroform:Methanol:Eisessig:Wasser = 46:29:6:3

b) Zusammenstellung der Sprühmittel:

käufliche Sprays: Bromthymolblau, Phosphomolybdänsäure, Ninhydrin; verschiedene Lösungen von Fluorescein, 2',7'-Dichlorfluorescein, Rhodamin B und 6G (186);
$K_2Cr_2O_7$ in H_2SO_4;
Kägi-Miescher-Spray: Eisessig:H_2SO_4 = 49:1, mit o,4 % Anisaldehyd;
Nitroprussid-Spray: 1,5 g $Na_2(Fe(CN)_5NO).2H_2O$ + 5 ml 2 N H_2SO_4 + + 95 ml Methanol + 1o ml 25 % NH_3, klar filtrieren (34);
Ioddampf

6.2. Versuchsbeschreibungen zu Kapitel 2.

Vorbemerkung:
Alle in Kapitel 6. nicht beschriebenen Methoden wurden genau wie in den im Text zitierten Literaturvorschriften ausgeführt.

6.2.1. Stöchiometrischer Test zur Gehaltsbestimmung von käuflichem CoA (Phosphotransacetylase-Methode)

Testansatz (verändert nach (67)):

1 ml o,1 M Tris-Puffer pH 7,6
+ 5o µl o,1 M Acetylphosphat, KLi-Salz
+ x µl $CoALi_3$-Lösung unbekannten Gehalts (max. 5o nMol)
+ (1oo-x)µl H_2O

mischen, Extinktion bei 233 nm ablesen (ergibt E_1)

+ 5 µl Phosphotransacetylase-Suspension (o,2 mg/ml ≙ ≙ 2oo U/ml in 3,2 M Ammoniumsulfatlösung)

mischen, Extinktionszunahme bis Stillstand der Reaktion verfolgen, Extinktion ablesen (ergibt E_2; $E_2 - E_1 = \Delta E$)

+ 5 µl Phosphotransacetylase-Suspension

mischen, Extinktion ablesen (ergibt E_3; $E_3 - E_2 = \Delta E'$; $\Delta E(korr) = \Delta E - \Delta E'$)

$\Delta E(korr)$ geht in die Berechnung ein (s.(67)).

6.2.2. Kinetischer Test zur CoA-Bestimmung in Aufschlußproben (Phosphotransacetylase/Citratsynthase/Malat-Dehydrogenase-Methode)

Testansatz (verändert nach (67)):

x µl CoA-Standardlösung oder Probe (nach (67) maximal o,6 nMol CoA; nach unseren Untersuchungen jedoch bis 2,5 nMol CoA/Küvette zulässig)
+ (15o-x)µl H_2o
+ 75o µl Puffer pH 8,o (o,2 M Triäthanolamin; 3o mM D,L-Malat)
+ 5o µl 1o mM DTT (oder DTE)

mischen, 15 min bei 25°C inkubieren

+ 1oo µl NAD-Acetylphosphatlösung (15 mM NAD; 5o mM Acetylphosphat, KLi-Salz)
+ 1o µl Malat-Dehydrogenase-Suspension (o,96 mg/ml ≙ ≙ 1o5o U/ml in 3,2 M Ammoniumsulfatlösung)
+ 1o µl Phosphotransacetylase-Suspension (o,75 mg/ml ≙ ≙ 75o U/ml in 3,o M Ammoniumsulfatlösung)

mischen, 5 min bei 25°C inkubieren

+ 1o µl Citratsynthase-Suspension (1,27 mg/ml ≙ 14o U/ml in 2,2 M Ammoniumsulfatlösung)

mischen, nach ca.1 min mit Registrierung des Extinktionsanstiegs bei 334 nm beginnen; die Extinktionsveränderung etwa 1o min lang verfolgen
ΔE/min mit Leerwert korrigieren, mit externem Standard eichen (Berechnung s.2.3.5.)
bei Eichung mit internem Standard nach 1o min Extinktionsmessung:
+ y µl CoA-Standardlösung (meist 2o µg CoA/ml; y = 2o)
mischen, wie oben 1o min lang die Extinktionsänderung verfolgen (Berechnung s.2.3.5.)

Die Grenzbedingungen für Eichung mit externem und internem Standard sind in 2.3. angegeben.

Bei Verwendung von Aufschlußproben, die bei -2o°C eingefroren worden waren, traten manchmal nach dem Auftauen Trübungen auf, die dann vor der Messung nach dem kinetischen Test in einer Christ-Tischzentrifuge abzentrifugiert wurden.

Bezeichnet man mit c den mit externem oder internem Standard berechneten CoA-Gehalt in der Küvette in (µg), so ist der CoA-Gehalt in 1 g (TG oder NG) aufgeschlossener Einwaage M:

$$\text{(XXIX) nMol CoA/g} = \frac{V(\mu l) \cdot 1000 \cdot c(\mu g)}{x(\mu l) \cdot M(g) \cdot 767{,}6(\mu g/\mu Mol)}$$

Für die Untersuchung der Hemmwirkung verschiedener Substanzen (s.2.3.6.) wurde ein Teil des anfangs zugegebenen Wassers durch eine entsprechend konzentrierte Lösung des Hemmstoffs ersetzt.

6.2.3. Acetylphosphatbestimmung nach der Hydroxamsäuremethode

1.Ansatz (nach (7o)):
2 ml Acetylphosphatlösung (sollen o,5 bis 5 µMol Acetylphosphat, KLi-Salz, enthalten)
+ 1 ml 2 M neutralisierte H_2NOH-Lösung (aus 1 Teil 4 M $NH_2OH.HCl$ und 1 Teil 3,5 M NaOH)
mischen, 1o min bei Raumtemperatur inkubieren
+ 3 ml $FeCl_3$-Reagens (aus 1 Teil 5 % $FeCl_3$ + 1 Teil 12 % TCA + 1 Teil 3 N HCl)
mischen, Extinktion bei 546 nm messen (die Vergleichsküvette enthält den gleichen Ansatz ohne Acetylphosphat)

2.Ansatz (nach (46)):

o,5 ml	neutralisierte Acetylphosphatlösung (KLi-Salz)
+ o,5 ml	2 M neutralisierte H_2NOH-Lösung

mischen, 15 min bei 37°C inkubieren

+ o,5 ml	3 N HCl
+ o,5 ml	$FeCl_3$-Reagens

weiter wie 1.Ansatz

Referenzstandards für beide Ansätze sind Acet- und Succinhydroxamsäure.

6.2.4. CoA-Bestimmung nach der Phosphotransacetylase/Arsenolyse/Hydroxamsäure-Methode

1.Ansatz (nach (46)):

1oo µl	1 M Tris-Puffer pH 8,o
+ 6o µl	114 mM Acetylphosphat-KLi-Lösung
+ 1oo µl	1oo mM Cystein.HCl-Lösung
+ x µl	CoA-Lösung
+ 1o µl	Phosphotransacetylase-Suspension (o,75 mg/ml ≙ ≙ 75o U/ml in 3,o M Ammoniumsulfatlösung)
+ (73o-x)µl	H_2O

mischen, 5 min bei 37°C inkubieren

+ 1oo µl	5oo mM Kaliumarsenat-Puffer pH 8,o

mischen, 1o min bei 37°C inkubieren

Aliquot in den 2.Ansatz aus 6.2.3. einpipettieren

2.Ansatz (für kleine CoA-Mengen optimiert):

(28o-x-y)µl	1 M Tris-Puffer pH 8,o
+ 2o µl	114 mM Acetylphosphat-KLi-Lösung
+ 1oo µl	1o mM DTE-Lösung
+ x µl	CoA-Lösung unbekannten Gehalts
+ y µl	Phosphotransacetylase-Suspension (o,75 mg/ml ≙ ≙ 75o U/ml in 3,o M Ammoniumsulfatlösung)

mischen, 5 min bei 37°C inkubieren

+ 1oo µl	5oo mM Kaliumarsenat-Puffer pH 8,o

mischen, t (min) bei 37°C inkubieren

weiter wie 2. Ansatz aus 6.2.3.

Die Optima lagen bei y = 1o (µl) und t = 2o (min).

6.2.5. DTNB-Methode zur SH-Bestimmung

Ansatz nach (75,187):

o,2 ml DTNB-Lösung (15,4 mg/5o ml Aceton)
+ o,2 ml 1 M Kaliumphosphat-Puffer pH 8,o
+ x ml SH-enthaltende Lösung (z.B.CoA, Cystein, DTT)
+ (1,6-x)ml H_2O

mischen, Extinktion bei 4o5 nm gegen Blindwert ohne -SH messen

Da der molare Extinktionskoeffizient des entstehenden gelben Anions (s.Gleichung (XII), 2.5.2.b)) stark von den Versuchs- und Gerätebedingungen abhängig ist (188), benutzten wir eine Eichkurve mit einer o,1 mM Cystein-Standardlösung; wie sich zeigte, bestand Linearität zwischen der eingesetzten Cysteinmenge und der gemessenen Extinktion bei 4o5 nm mindestens zwischen 1o und 1oo nMol Cystein im Test (Konzentration 5 bis 5o µM).

6.3. Versuchsbeschreibungen zu Kapitel 3.

6.3.1. Bestimmung von LCFA-CoAs durch alkalische Hydrolyse und anschließende enzymatische Bestimmung des freigesetzten CoA

Ansatz für die Aufstellung von Verseifungskurven:

o,1 ml Acyl-CoA-Lösung unbekannten Gehalts
+ o,1 ml 4o mM DTT
+ o,2 ml 2 N KOH (Normalität gegen 1 N HCl mit Indicator Bromkresolpurpur einstellen)

mischen, verschieden lange (1 bis 6o min) bei verschiedenen Temperaturen (o°, 25°, 3o°, 37°C) inkubieren

+ o,4 ml 1 N HCl
+ 2,2 ml 1oo mM Kaliumphosphat-Puffer pH 6,o

mischen, Aliquot (bis 15o µl) in kinetischen Test-Ansatz nach 6.2.2. einpipettieren

Bezugswerte: O- ≙ o,1 ml Acyl-CoA-Lösung
+ 2,9 ml 1oo mM Kaliumphosphat-Puffer pH 6,o
O+ ≙ o,1 ml Acyl-CoA-Lösung
+ 2,2 ml 1oo mM Kaliumphosphat-Puffer pH 6,o
+ o,1 ml 4o mM DTT

+ o,4 ml 1 N HCl
+ o,2 ml 2 N KOH (in dieser Reihenfolge zugeben)

6.3.2. Vorschriften zu Kapitel 3.3.2.

Fettsäuresynthetase aus Rattenleber wurde nach (189) angereichert. Aus 5 Anreicherungen mit 12o Rattenlebern erhielten wir nur 85 mU (spezifische Aktivität 21,7 mU/mg). In Übereinstimmung mit (189) erwies sich das Enzym als wenig stabil. Zum Test benutzten wir folgenden Ansatz (Testvolumen 1 ml):

bis 43o µMol Kaliumphosphat-Puffer pH 7,o
+ 1 µMol DTT
+ 2oo nMol NADPH
+ ca.7onMol Acetyl-CoA
+ x µg Rattenleber-Fettsäuresynthetase (maximal 1o ug DEAE-Cellulose-gereinigtes Enzym)

Start mit 1oo nMol Malonyl-CoA

Fettsäuresynthetase aus Hefe wurde nach (19o) angereichert und getestet.

Die Herstellung von Acetyl-CoA erfolgte nach (7o) aus CoA und Acetanhydrid. Die Ausbeute wurde nach (67,191) zu 92 bis 95 % bestimmt.

Malonyl-CoA wurde nach (192) synthetisiert. Die Gehaltsbestimmung nach (187) ergab eine Ausbeute von 99,8 %.

6.3.3. Aufnahme von Differenzspektren

Zum Teil benutzten wir den Ansatz von 6.3.1. (oder einen analogen Ansatz) mit folgenden Küvettenfüllungen:

	Meßküvette	Vergleichsküvette
(1)	O- oder O+	3 ml 1oo mM Kaliumphosphat-Puffer pH 6
(2)	verseifter Ansatz	3 ml 1oo mM Kaliumphosphat-Puffer pH 6
(3)	Meßküvette (1)	Meßküvette (2)

Im Idealfall entspricht UV-Spektrum (1) dem theoretischen LCFA-CoA-Spektrum (λ_{max} 26o nm), (2) dem CoA-Spektrum (λ_{max} 26o nm), (3) dem Differenzspektrum (λ_{max} 232 nm).

Außerdem benutzten wir die Vorschrift (34) (gleiche Numerierung wie oben):

	Meßküvette	Vergleichsküvette
(1)	3o µl PCoA + 1,97 ml 4o mM Kaliumphosphat-Puffer pH 6	2 ml 4o mM Kaliumphosphat-Puffer pH 6
(2)	3o µl PCoA + 2oo µl 1 N NaOH + 57o µl H_2O 15-3o min verseifen lassen + 2oo µl 1 N HCl + 2oo µl Methanol + 8oo µl 1oo mM Kaliumphosphat-Puffer pH 6	2 ml 4o mM Kaliumphosphat-Puffer pH 6
(3)	Meßküvette (1)	Meßküvette (2)

Die Volumina sind natürlich in gewissen Grenzen variabel.

6.3.4. Radiochemischer Test für 1-^{14}C-PCoA

Ansatz:

o,1 ml 1-^{14}C-PCoA-Lösung
+ 1 ml H_2O
+ 1 ml 25 % NH_3

mischen, 2o min bei 37°C inkubieren; am Rotationsverdampfer zur Trockene bringen

+ 1 ml 1 N HCl
+ 1 ml Petroläther

ausschütteln; Oberphase abhebern; Radioaktivität in der Oberphase bestimmen

6.3.5. Synthese und Reinigung von LCFA-CoAs

1facher Ansatz (verändert nach (8o)):

7,6 mg ≙ 3o µMol Palmitinsäure in NS-14,5-Reagenzglas überführen

(für Synthese von 1-^{14}C-PCoA zusätzlich:
+ x µl (je nach gewünschter spezifischer Aktivität) 1-^{14}C-Palmitinsäurelösung in Benzol zugeben

am Rotationsverdampfer einengen, ca.3o min lyophilisieren)

+ 1,5 ml Tetrahydrofuran (unmittelbar vorher über $LiAlH_4$ destillieren)

auf -2o°C kühlen

+ 4,2 µl ≙ 3o µMol Triäthylamin

+ 2,8 µl ≙ 3o µMol Chlorameisensäureäthylester (⟶ Gemisch 1)

Nach ca.2 h müssen dichte Kristallnadeln ausgefallen sein; sonst muß nochmals von vorne begonnen werden.

2o mg CoA ≙ ca.25 µMol (abhängig vom Gehalt, nach 6.2.1. festzustellen) CoA in 1 ml H_2O lösen

mit $NaHCO_3$ auf pH 8,5 bis 9 bringen (Kontrolle mit Glaselektrode) (⟶ Gemisch 2)

Gemisch 1 zu Gemisch 2 geben; 3o min bei Raumtemperatur pH mit $NaHCO_3$ bei pH 8,5 bis 9 halten (Kontrolle mit Glaselektrode) in kleinen NS-29-Rundkolben überführen, mit 1 N HCl ansäuern, lyophilisieren

Die Herstellung von 9,1o-^{3}H-PCoA, 1-^{14}C-Stearyl- und 1-^{14}C-Lauryl-CoA erfolgte analog.

Zweckmäßiger erwies sich ein größerer Ansatz (meist 5fach); die prozentuale Ausbeute steigt mit der eingesetzten Menge.

Die Reinigung erfolgte, wie in 3.4.2. beschrieben. Dünnschichtchromatographische und säulenchromatographische Reinigungen wurden in enger Anlehnung an die in 3.4. . angegebenen Literaturstellen ausgeführt.

6.3.6. Bestimmung der CMC

Ansatz (nach (122), verändert nach (122,124) und E.Conzelmann, persönliche Mitteilung):

Meßküvette: 3 ml Rhodamin 6G-Lösung (2 mg/1oo ml H_2O)

+ x µl o,234 mM PCoA-Lösung (x sukzessive von o auf 1oo erhöhen; PCoA ebenfalls in Rhodamin 6G-Lösung gelöst)

Vergleichsküvette: 3 ml Rhodamin 6G-Lösung

mischen, Extinktionsdifferenz bei 55o nm messen; halblogarithmische Auftragung von ΔE_{55o} gegen log (PCoA)/(pH)

6.3.7. Gaschromatographie

a) Derivatisierung

Die Perameisensäurespaltung der Thioesterbindung erfolgte nach (193), die Herstellung der Diazomethanlösung in 1/5 Ansatz nach (194) und die Methylierung nach (195).

Im allgemeinen bevorzugten wir jedoch die BF_3-CH_3OH-Methode mit vorausgehender alkalischer Hydrolyse in einem zu 6.3.1. analogen Ansatz (ohne DTT). Die Derivatisierung wurde leicht verändert nach (196) durchgeführt:

Die Fettsäuren werden mit o,3 ml BF_3-CH_3OH (14 % w/v) versetzt und im Trockenschrank 3o min auf 1oo°C erhitzt. Nach Abkühlung fügt man 2 ml H_2O und 1 ml n-Hexan zu und schüttelt gründlich.

Nach Trennung der Schichten wird die Oberphase abgehebert, mit $NaHCO_3$ neutral gewaschen und im N_2-Strom in Pierce-Gläschen (innen spitz zulaufend, mit Teflonkappe und Schraubverschluß) zur Trockene gebracht. Im Exsiccator wird völlig getrocknet; die Fettsäuremethylester werden sodann in n-Heptan gelöst.

b) Gaschromatographie

Gaschromatograph: 575o G, Hewlett-Packard
Glassäule: 6 feet
Säulenfüllung: 6 % DEGS-Polyester auf Chromosorb W 8o-1oo mesh
Programmierte zeitlineare Temperatursteuerung der Säule von 1oo (bzw.12o bzw.13o°) bis 22o°C mit 4°/min
"Post Injection Interval": 4 min
"Upper Limit Interval": 12 min
Flammenionisationsdetektor: 25o°C
Einspritzblock: 25o°C
Trägergas: Stickstoff
Durchflußgeschwindigkeit: 6o ml/min
Papiervorschub: 1,25 cm/min

Die Einspritzung erfolgte mit einer 1o µl-Hamiltonspritze (Verdünnung, wenn nötig, mit n-Heptan).

Die Gipfel wurden mit Hilfe des elektronischen Integrators 338o der Firma Hewlett-Packard ausgewertet.

6.4. Versuchsbeschreibungen zu Kapitel 4.

6.4.1. Säureaufschluß von Hefe

Frische Hefe wird im Mörser unter flüssigem N_2 fein zerrieben (Plastikzentrifugenbecher und Spatel inzwischen vorkühlen). Von einem Aliquot wird die TG-Bestimmung gemacht:

Einige g werden in ein Präparateglas gegeben (≙ NG), das sodann in eine mit P_4O_{10}-Trockenmittel (mit Blaugel) beschickte "Trockenpistole" gesteckt wird. Die Trocknung erfolgt bei 4o°C unter Wasserstrahlpumpenvakuum. Nach ca.2o bis 24 h wird das TG bestimmt und sein Anteil am NG errechnet. (Bei Trocknung im Exsiccator bei Raumtemperatur ergaben sich ähnliche Werte)

den Hauptteil in 2 g-Portionen in Plastikzentrifugenbecher abfüllen,
mit 1o ml 6 % $HClO_4$ versetzen
1 min unter Eiskühlung beschallen
1o min bei 17ooo U/min zentrifugieren (SS 34-Rotor)
Überstand in ein 5o ml-Becherglas dekantieren
Rückstand 2 bis 3mal auf gleiche Weise mit 2 ml (oder 5 ml) 6 % $HClO_4$ extrahieren
Überstände vereinigen

a) Weiterverarbeitung der Überstände:

vereinigte Überstände mit $KHCO_3$ auf pH 6 bis 7 einstellen
1o min bei 17ooo U/min zentrifugieren, Überstand abdekantieren
Volumen des Überstands bestimmen
Aliquot (max.15o µl) in Testansatz nach 6.2.2. pipettieren
(ergibt "lösliches CoA")

b) Weiterverarbeitung des Rückstands:

den Rückstand mit o,7 ml H_2O, o,2 ml o,1 M DTT und 1,1 ml 1 N KOH versetzen, 1 min mit Ultraschall behandeln

Durchmischung kontrollieren und pH nachprüfen (ca.12)
evtl. weitere KOH zugeben
3o min bei 3o°C verseifen lassen (Wasserbad)
mit 6 % $HClO_4$ ansäuern, 1o min bei 17ooo U/min zentrifugieren (SS 34)
Überstand in Plastikzentrifugenbecher überführen
Rückstand 2 bis 3mal auf gleiche Weise mit 6 % $HClO_4$ extrahieren
Überstände vereinigen, mit $KHCO_3$ neutralisieren
1o min bei 17ooo U/min zentrifugieren (SS 34)
Überstand abdekantieren
Volumen des Überstands bestimmen
Aliquot (max.15o µl) in Testansatz nach 6.2.2. pipettieren
(ergibt "unlösliches CoA")

Die Aufschlüsse mit den Kombinationen $NaHCO_3/HClO_4$, $NaHCO_3$/TCA und $KHCO_3$/TCA wurden entsprechend durchgeführt.

Verarmte bzw. angereicherte Hefe wurde abzentrifugiert und wie frische Hefe weiterbehandelt. Der Aufschluß von FPP und von Schweineleberlyophilisat erfolgte ebenfalls analog zu dem Aufschluß von frischer Hefe; eine TG-Bestimmung ist hier jedoch überflüssig (wegen TG = NG).

6.4.2. Verarmung und Anreicherung von Hefe

a) Verarmung:

12 g NG Hefe in 6oo ml dest.H_2O in einem Fernbachkolben suspendieren,
im Brutschrank bei 3o°C kräftig rühren,
mit 9ooo U/min abzentrifugieren (GS 3-Rotor),
nach 6.4.1. weiterverarbeiten

b) Anreicherung:

12 g NG Hefe in 6oo ml Lösung (Zusammensetzung s.Tab.34 und 35)
in einem 2 l-Erlenmeyerkolben suspendieren
in einem Wasserbad bei 3o°C inkubieren
mit Hilfe eines Gaseinleitungsrohres mit konisch erweiterter Öffnung (für eine gute Durchmischung der Suspension) O_2 durchblasen oder mit einer an das Gasausleitungsrohr angeschlossenen

Wasserstrahlpumpe Luft durchsaugen,
mit 9ooo U/min (GS 3-Rotor) abzentrifugieren,
nach 6.4.1. weiterverarbeiten

6.4.3. Bestimmung von Äthanol mit Alkoholdehydrogenase

Die Bestimmung von Äthanol beruht auf der durch Alkohol-Dehydrogenase katalysierten Reaktion:

(XXX) Äthanol + NAD^+ = Acetaldehyd + NADH + H^+

Es handelt sich um eine Endwertmethode, bei der die Bildung von NADH, gemessen durch die Extinktionszunahme bei 334 nm, der Äthanolmenge proportional ist. Das Gleichgewicht wird im alkalischen Bereich durch Abfangen des Acetaldehyds mit Semicarbazid auf die rechte Seite verschoben.

Ansatz (nach (197,198)):

	75 µMol	$Na_4P_2O_7$-Puffer pH 8,7
+	75 µMol	Semicarbazid
+	21 µMol	Glycin
+	o,8 µMol	NAD
+		Äthanol bis maximal 15o µM

Start mit o,2 mg ≙ 6o U Alkohol-Dehydrogenase aus Hefe
Endvolumen 1,1o67 ml

Sämtliche Reagenzien müssen vom höchsten Reinheitsgrad sein, insbesondere das Semicarbazid, das häufig etwas Äthanol enthält. Die Lösungen müssen mit bidest.H_2O hergestellt und täglich frisch angesetzt werden. Werden die Lösungen den ganzen Tag verwendet und stehen daher unverschlossen, muß der Blindwert alle paar Stunden nachkontrolliert werden.

6.4.4. Manometrische Messungen

Der allgemeinen Information über Messungen an Warburgapparaturen dienen verschiedene Monographien, z.B.(199) oder (138). Die hier besprochenen Messungen wurden an der automatischen Warburgapparatur des MPI für Biochemie, Martinsried, durchgeführt, und zwar mit Warburggefäßen, die mit je 2 Seitengefäßen und einem

gehalterten Einsatz versehen waren. Die Apparatur wurde mit einem Wasserbad auf 3o°C eingestellt.

a) Bestimmung der Atemgröße:

Hefesuspensionen der Konzentrationen 2o bzw. 1o mg NG/ml herstellen, außerdem eine 17 % (v/v) Äthanollösung
die Gefäße nach folgendem Schema füllen:

Gefäß-Nr.	142o	1412	1421	1413
	Leerprobe		Leerprobe	
Hauptgefäß: 3 ml	1o mg/ml-Hefesusp.		2o mg/ml-Hefesusp.	
1.Seitengefäß: o,2ml	Wasser	Äthanollsg.	Wasser	Äthanollsg.
2.Seitengefäß: o,2ml	Wasser	Wasser	Wasser	Wasser
Hefe-Endkonz.	8,8 mg/ml	8,8 mg/ml	17,7mg/ml	17,7mg/ml
Äthanol-Endkonz.	-	1 %(v/v)	-	1 %(v/v)

in den Einsatz o,2 ml 2 N KOH und eine Glasperle geben
die Gefäße verschließen und zusammen mit einem Thermobarometer an der Apparatur im Wasserbad ständig schütteln
nach 1o min Temperierung bei einem Brodie-Stand von 18o mm alle 5 min den Manometerstand ablesen
Korrektur und Berechnung nach (199,138)

b) Bestimmung des O_2/Äthanol-Molverhältnisses:

die Gefäße nach folgendem Schema füllen:

Gefäß-Nr.	1412	1413	142o	1421
	Leerprobe			
Hauptgefäß: 3ml	1o mg/ml-Hefe-Suspension, d.h.3o mg Hefe/Gefäß			
1.Seitengefäß:o,2ml	Wasser	1o mM Äthanol	25 mM Äthanol	5o mM Äthanol
2.Seitengefäß:o,2ml	Wasser	Wasser	Wasser	Wasser
Äthanol/Gefäß	-	2 µMol	5 µMol	1o µMol

weiter wie unter a)

6.5. Versuchsbeschreibungen zu Kapitel 5.

6.5.1. Extraktionsmethoden

Die unten genannten Materialien (Hefe, verschiedene FPP, Schweine- und Rattenleber, frisch und lyophilisiert, vor oder nach $HClO_4$-Denaturierung) wurden mit folgenden Methoden extrahiert (die Volumina sind jeweils auf 1 g TG oder 2 g NG bezogen):

A ≙ 3mal 3 h mit 2o ml Extraktionsmittel rühren
B ≙ 1 min mit 5 ml Extraktionsmittel bei o°C verreiben, 1 min Ultraschall
C ≙ 16 h mit 3o ml Extraktionsmittel bei Raumtemperatur rühren
D ≙ über Nacht im Soxhlet mit 1oo ml Extraktionsmittel extrahieren
E ≙ über Nacht mit 5o ml Extraktionsmittel bei Raumtemperatur rühren
F ≙ über Nacht mit 5o ml Extraktionsmittel bei 4°C rühren
G ≙ 4 h mit 4o ml Extraktionsmittel bei 4°C rühren
H ≙ 2 min mit 5 ml Extraktionsmittel bei o°C verreiben
I ≙ wie H, dann 2mal 1 min Ultraschall
J ≙ wie H, dann 1 min Ultraschall

Die Extrakte wurden am Rotationsverdampfer bzw.Gefriertrockner eingeengt und zur CoA-Messung wie unter 6.4.1. weiterverarbeitet; in vielen Fällen wurden auch die Rückstände aufgeschlossen.

Wird ein nichtsäuregefälltes biologisches Material extrahiert, ist zur Trennung von löslichem und unlöslichem CoA $HClO_4$-Fällung des eingeengten Extraktes notwendig; wird dagegen gewaschener Hefe- oder Leber-$HClO_4$-Niederschlag extrahiert, so kann wie unter 6.4.1.b) weiterverarbeitet werden (vgl.5.1.2.).

Die Extraktion von zugesetztem 1-^{14}C-PCoA und zugesetzter 1-^{14}C-Palmitinsäure aus biologischem Material wurde auf die gleiche Weise durchgeführt (meist mit Prozedur B); zur Radioaktivitätsmessung s.6.1.3.b). Auch die in 5.2.1. beschriebenen differentiellen Extraktionen erfolgten analog.

Whatman 1-Papier wurde durch 1o-minütiges Schwenken in 1o ml Extraktionsmittel extrahiert.

6.5.2. Verfolgung der Extraktion von LCFA-CoA-Verbindungen mit dem kinetischen Test (Phosphotransacetylase/Citratsynthase/Malat-Dehydrogenase-Methode)

a) In der Literatur beschriebene Extraktionsmittel

In Tab.43 sind verschiedene, in der Literatur beschriebene Lösungsmittelsysteme für die Extraktion von FFA, Neutrallipiden, Gesamtlipid sowie LCFA-CoA-Verbindungen aus wäßrigen Inkubationsmischungen und aus biologischem Material (Hefe, Bakterien, Leber, Fettgewebe, Organlyophilisaten) angeführt. In fast allen Fällen wurde mit Säure vorbehandelt (HCl, $HClO_4$, H_2SO_4 usw.). Colli (85) bestimmte die Wiederfindungsraten in Chloroform:Methanol = 2:1 und Pyridin:Isopropanol:Wasser = 1:1:1 wie folgt:

	^{14}C-markierte(s)			
Wiederfindungsraten in	PCoA	Palmitinsäure	Phosphatidylcholin	Acetyl-CoA
Chloroform:Methanol = 2:1	3,5 %	5o %	98-1oo %	-
Pyridin:Isopropanol:Wasser = 1:1:1	8o-85%	< o,1 %	-	< o,1 %

Chloroform:Methanol = 2:1 ist mithin ein gutes Extraktionsmittel für Lipide, aber ein schlechtes für PCoA, während es sich für Pyridin:Isopropanol:Wasser = 1:1:1 umgekehrt verhält. Bei genauerer Untersuchung der in Tab.43 angeführten Extraktionsmittel sind daher ebenfalls deutliche Unterschiede im Extraktionsverhalten zu erwarten. In diesem Kapitel (6.5.2.) soll zunächst die Extraktion der LCFA-CoAs mit Hilfe des kinetischen Tests verfolgt werden, in 6.5.3. durch Zugabe von radioaktiv markiertem PCoA zu Beginn der Extraktion.

b) Grundsätzliches zur Extraktion

Mit dem kinetischen Test verfolgten wir die Extraktion von LCFA-CoAs nur aus Hefepräparationen, d.h.aus frischer, aus angereicherter, aus durch Lyophilisieren pulverisierter und aus mit dem Manton-Gaulin-Zellhomogenisator aufgeschlossener Hefe (EPP) sowie aus den entsprechenden $HClO_4$-Niederschlägen; die

Tab.43: In der Literatur beschriebene Extraktionsmittel

1) Freie Fettsäuren:

a) Inkubationsmischungen:

(18,2oo)	Petroläther (3o-5o°)
(7o)	Äther
(4o)	n-Heptan
(2o1)	Äthanol, Pentan
(1o5)	Aceton, Äther
(1o8)	Isopropanol + Petroläther
(81)	Äther:Äthanol = 1:1
(2o2)	Chloroform:Methanol:Eisessig = 1o:2o:3 (Papier)

b) biologisches Material:

(17)	Äther (Leber)

2) Neutrallipide:

a) Inkubationsmischungen:

(11o)	Petroläther, gesättigt mit Isopropanol:Wasser = 1:1

b) biologisches Material:

(133)	Chloroform:Methanol = 2:1 (Fettgewebe)
(14o)	Chloroform:Methanol = 9:1 (Leber)

3) Lipide allgemein:

a) Inkubationsmischungen:

(2o3,2o4)	Chloroform:Methanol = 1:1
(88)	Chloroform:Methanol = 2:1
(2o5)	Tris-Puffer:Aceton = 1:9

b) biologisches Material:

(22,133)	Äther
(14o)	Butanol (Leber)
(118)	Chloroform:Methanol = 1:1 (Leber)
(85,112,13o)	Chloroform:Methanol = 2:1 (Leber)
(31,2o6)	Chloroform:Methanol = 2:1 (Hefe)
(2o7)	Chloroform:Methanol = 2:1, mit 5 % Wasser (Lyophilisate
(143)	Äthanol, Chloroform:Methanol = 2:1
(2o8)	Chloroform:Methanol:Wasser = 5:1o:4 (Bakterien)

4) LCFA-CoA-Verbindungen:

a) Inkubationsmischungen:

(1o5)	Wasser pH 5
(1o8)	Butanol, wassergesättigtes Butanol
(11o)	Chloroform:Methanol = 1:2

Tab.43: Fortsetzung von S.2o8

(2o9)	Chloroform:Methanol:Wasser = 5:1o:4
(87)	Methylenchlorid:Methanol:HCl = 3o:1o:1
(86,89)	Butanol:Äthanol:o,o3 N HCl = 1:1:1
(4o,81,85,2o1)	Pyridin:Isopropanol:Wasser = 1:1:1
b) biologisches Material:	
(79)	o,2 M Phosphatpuffer pH 6 (1o mg BSA/ml) (Leber)
(17,21o)	Pyridin:Wasser = 1:1 (Leber)
(79)	Pyridin:Isopropanol:Wasser = 1:1:1 (Leber)

Extraktionen aus anderen Materialien wie Schweineleber-Lyophilisat werden in 6.5.3. behandelt (Verfolgung der Extraktion durch Zugabe von 1-^{14}C-PCoA).

Nach Tab.43 und dem in 6.5.2.a) Gesagten sind polarere Extraktionsmittelsysteme, insbesondere Mischungen von Pyridin mit Wasser (und evtl.Isopropanol) für die Extraktion von LCFA-CoAs geeignet, während für Lipide meist Chloroform-Methanol-Mischungen verwendet werden. Auch wir konnten besonders gute Extraktion mit solchen Mischungen beobachten, besonders mit Pyridin:Isopropanol:Wasser = = 1:1:2 ("E2"; s.6.5.2.c) und 6.5.3.). Die Verwendung von pyridinhaltigen Extraktionsmitteln hat allerdings den Nachteil, daß im Aufschluß mitgeschleppte Lösungsmittelspuren den kinetischen Test beeinträchtigen können (s.2.3.6.a)); diese Störung kann jedoch durch Eichung mit internem Standard eliminiert werden. Die bei Eichung mit externem Standard erhaltenen Testergebnisse konnten durch Entfernung des Pyridins mit Äther nicht verbessert werden: Das Waschen mit Äther vor der Verseifung des Extraktes oder Rückstandes ist unzweckmäßig, da Äther bei einmaliger Behandlung bis zu 16 % LCFA-CoA herauslöst. Ausschütteln der verseiften und neutralisierten Probe mit Äther unmittelbar vor dem Test erwies sich als nutzlos, da sich auch bei externer Eichung im wesentlichen die gleichen CoA-Werte ergaben wie ohne diese Behandlung. Auch 5o-minütige Wasserdampfdestillation bei Raumtemperatur unter vermindertem Druck änderte die Meßwerte nicht signifikant.

Die Befürchtung, durch das Pyridin könnten die LCFA-CoA-Thiolester partiell verseift werden, bestätigte sich nicht; in E2-

Extrakten von Hefe-$HClO_4$-Niederschlägen fanden wir ohne zusätzliche KOH-Verseifung nur o bzw. o,2 nMol CoA/g TG (o bzw. o,7 % des Ausgangswerts von 28,5 nMol unlöslichem CoA/g TG), mit zusätzlicher KOH-Verseifung dagegen 17,3 nMol CoA/g TG ≙ 6o,7 %.

Die Extraktion erfolgte nach verschiedenen Verfahren (s.6.5.1.): Es wurde u.a. mit größeren Volumina Extraktionsmittel längere Zeit gerührt, in der Soxhletapparatur extrahiert, mit kleineren Volumina kurze Zeit verrieben und/oder mit Ultraschall behandelt. Dabei konnten neben der Art des Extraktionsmittels Volumen, Dauer der Extraktion und Arbeitstemperatur variiert werden. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Tab.44, 45 und 46 dargestellt. Volumen des Extraktionsmittels und Extraktionsdauer haben anscheinend keinen großen Einfluß, so lange dieselbe Extraktionsmethode angewendet wird. Deutlich ist jedoch der Einfluß der Temperatur (Tab.45) Bei vergleichbar langer Extraktion mit größenordnungsmäßig vergleichbaren Volumina des gleichen Extraktionsmittels (Äthanol: :1 N HCl = 1:1) wurden bei 4°C 21,6 %, bei Raumtemperatur 47,8 % und bei Siedetemperatur nur 9,7 % des Ausgangswerts an unlöslichem CoA extrahiert. In Übereinstimmung mit den in 5.1.1. für die Lipidextraktion gemachten Angaben erhält man bei Raumtemperatur also ein Maximum (zumindest mit diesem Extraktionsmittel). Die meisten Extraktionen, insbesondere mit E2 und mit anderen pyridinhaltigen Lösungsmitteln, führten wir jedoch vorsichtshalber bei o bis 4°C aus, da - insbesondere in Leberpräparationen - beachtliche Thioesteraseaktivitäten beobachtet wurden.

c) Vergleich der mit verschiedenen Extraktionsmitteln erhaltenen Extraktionsausbeuten

Mit der Typ II-Extraktion (s.5.1.2.) kann auch die Extraktion von löslichem CoA verfolgt werden, was hier zwar nur am Rande interessiert, der Vollständigkeit halber aber in Tab.44 angegeben ist (Eichung des kinetischen Tests mit externem Standard). Da keine Vergleichswerte für lösliches CoA in nichtextrahierter Hefe mitgemessen wurden, enthält Tab.44 nur absolute Werte und keine prozentualen Ausbeuten, so daß wegen des wechselnden CoA-Gehalts der verschiedenen Hefeproben nur halbquantitative Schlüsse auf das Extraktionsvermögen der einzelnen Lösungsmittel-Systeme gezogen

Tab.44: Extraktion von löslichem CoA aus Hefe
(Test b4 aus Tab.5; Eichung mit externem Standard)
Extraktionsverfahren s.6.5.1.

Material	Extraktionsmittel	Prozedur	lösl.CoA extrahiert (nMol/g TG)
Hefe lyophilisiert	Chloroform:Methanol = 1:1	A	17,3
	Chloroform:Methanol = 2:1	A	36,4
	Chloroform:Methanol = 3:1	A	32,8
	Chloroform:Methanol = 1:2	A	14,4
	Chloroform:Methanol:1 N HCl = 124:65:1	A	16,3
FPP 1	Chloroform:Methanol = 1:1	A	19,8
	Chloroform:Methanol = 2:1	A	21,3
	Chloroform:Methanol = 1:2	A	22,5
	Pyridin:Isopropanol:Wasser = 1:1:2 (E2)	A	92,o
	Pyridin:Isopropanol:Wasser = 1:1:1	A	1oo,2
	E2 + Eisessig ad pH 6	A	32,2
FPP 1	Pyridin:Isopropanol:Wasser = 1:1:2 (E2)	B	37,2
	Aceton	B	o,o
	Chloroform:Methanol = 2:1	B	6,6
	Butanol:Eisessig:Wasser = 3:1:1	B	7,2

werden können. Butanol:Eisessig:Wasser = 3:1:1 und die untersuchten Chloroform-Methanol-Gemische sind alle ungefähr gleich schlechte Extraktionsmittel für lösliches CoA, während die Mischungen Pyridin:Isopropanol:Wasser = 1:1:2 und = 1:1:1 etwa fünfmal so viel CoA extrahieren. Aceton extrahiert überhaupt kein lösliches CoA.

Die für die Extraktion von unlöslichem CoA aus Hefe erhaltenen Werte sind in den Tabellen 45 und 46 wiedergegeben, und zwar in Tab.45 für Eichung mit externem Standard, in Tab.46 für Eichung mit internem Standard. Direkte Vergleiche zwischen einzelnen Extraktionsmitteln sind nur innerhalb einer Reihe mit gleicher Extraktionsprozedur möglich. So lassen sich etwa aus Tab.45 folgende Schlüsse ziehen:
FPP 1 läßt sich mit E2, Aceton, Chloroform:Methanol = 2:1 leichter extrahieren als FPP 1-$HClO_4$-Niederschlag, mit Butanol:Eisessig:

Tab.45: Extraktion von unlöslichem CoA aus Hefe (Test b4 aus Tab.5; Eichung mit externem Standard)
Kontrolle ≙ Vergleichswert für unlösliches CoA in nichtextrahierter Hefe (gleiche Charge)

Material	Extraktionsmittel	Prozedur	Kontrolle (nMol/g TG)	unlsl.CoA extrahiert (nMol/g TG)	unlsl.CoA extrahiert in %
Hefe lyophilisiert	Chloroform:Methanol = 1:1	A	-	8,9	-
	Chloroform:Methanol = 2:1	A	-	14,9	-
	Chloroform:Methanol = 3:1	A	-	7,o	-
	Chloroform:Methanol = 1:2	A	-	6,o	-
	Chloroform:Methanol:1 N HCl = 124:65:1	A	-	5,1	-
FPP 1	Chloroform:Methanol = 1:1	A	14,8	6,o	4o,5
	Chloroform:Methanol = 2:1	A	14,8	6,1	41,2
	Chloroform:Methanol = 1:2	A	14,8	5,9	39,9
	E2 + Eisessig ad pH 6	A	14,8	5,7	38,5
	Pyridin:Isopropanol:Wasser = 1:1:2 (E2)	B	-	19,3	-
	Aceton	B	-	3,6	-
	Chloroform:Methanol = 2:1	B	-	2,1	-
	Butanol:Eisessig:Wasser = 3:1:1	B	-	4,o	-
FPP 1-$HClO_4$-Niederschlag	Pyridin:Isopropanol:Wasser = 1:1:2 (E2)	B	-	13,8	-
	Aceton	B	-	1,5	-
	Chloroform:Methanol = 2:1	B	-	1,8	-
	Butanol:Eisessig:Wasser = 3:1:1	B	-	1o,2	-
Hefe-$HClO_4$-Niederschlag	Pyridin:Isopropanol:Wasser = 1:1:2 (E2)	B	17,6±o,2(3)	13,7	77,8
	Pyridin:Isopropanol:Wasser = 1:1:2 (E2)	B	9,1±o,5(2)	6,4±1,4(2)	7o,3
	Pyridin:Isopropanol:Wasser = 1:1:1	B	9,1±o,5(2)	4,8±o,1(2)	52,7
	Pyridin:Wasser = 1:1	B	9,1±o,5(2)	5,6±1,o(2)	61,5

Tab.45: Fortsetzung von S.212
(Extraktionsverfahren s.6.5.1.)

Material	Extraktionsmittel	Prozedur	Kontrolle (nMol/g TG)	unlsl.CoA extrahiert (nMol/g TG)	unlsl.CoA extrahiert in %
Hefe-$HClO_4$-Niederschlag (Äthanol-angereicherte Hefe)	Äthanol:1 N HCl = 1:1	C	23,2	11,1	47,8
	Äthanol:1 N HCl = 1:1	D	1o,8	1,5	9,7
	Pyridin:Isopropanol:Wasser = 1:1:2 (E2)	E	12,5	6,7	53,6
	Äthanol:1 N HCl = 1:1	F	13,9	3,o	21,6
	Äthanol:1 N HCl = 1:1	G	32,3	1,3	4,o
	Pyridin:Isopropanol:Wasser = 1:1:2 (E2)	G	32,3	17,8	55,1
	Pyridin:Isopropanol:Wasser = 1:1:2 (E2)	H	46,6	32,6	69,6
	Pyridin:Isopropanol:Wasser = 1:1:1	H	46,6	27,o	57,9
	Pyridin:Wasser = 1:1	H	26,3	13,o	49,4
	Äthanol:1 N HCl = 4:1	H	46,6	14,6	31,3
	Äthanol:1 N HCl = 9:1	H	53,8	9,5	17,7
	Äthanol:1o N HCl = 9:1	H	53,3	6,o	11,2
	Äthanol:1o N HCl = 4:1	H	53,8	2,4	4,5
	Methylenchlorid:Methanol:c.HCl = 3o:1o:1	H	26,3	o,3	1,1
	Äthanol:1 N HCl = 1:1	H	28,3	1,7	6,o
		2xH		1,9	6,7
		3xH		1,9	6,7
	Pyridin:Isopropanol:Wasser = 1:1:2 (E2)	H	39,4	19,6	49,8
		2xH		23,8	6o,4
		3xH		24,5	62,2
	Pyridin:Isopropanol:Wasser = 1:1:2 (E2)	H	28,5	17,3	6o,7
	Pyridin:Isopropanol:Wasser = 1:1:2 (E2)	I	26,2	2o,1	76,8
	Pyridin:Isopropanol:Wasser = 1:1:2 (E2)	J	26,2	17,6	67,2
	Phenolum liquefactum	H	19,7±2,o	o,o	o,o

Tab.46: Extraktion von unlöslichem CoA aus Hefe
(Test b4 aus Tab.5; Eichung mit internem Standard)
(Extraktionsverfahren s.6.5.1.)

Material	Extraktionsmittel	Prozedur	Kontrolle (nMol/g TG)	unlsl.CoA extr. (nMol/g TG)	in %
FPP 1	E2	B	-	16,o±1,9(2)	-
Hefe-$HClO_4$-Niederschlag	E2	B	31,2±4,1(2)	12,o±2,o(2)	38,5
FPP 1-$HClO_4$-Niederschlag	Aceton	B	-	o,7	-
	E2	B	-	8,7	-

:Wasser = 3:1:1 dagegen schwerer (Prozedur B). Mit Aceton und Chloroform:Methanol = 2:1 kann nur sehr wenig unlösliches CoA extrahiert werden.
Chloroform-Methanol-Gemische extrahieren aus FPP 1 etwa 4o % des unlöslichen CoA, unabhängig von der Zusammensetzung (Prozedur A). Mit Eisessig auf pH 6 eingestelltes E2 extrahiert unter denselben Bedingungen allerdings auch nicht mehr.

Für die verschiedenen Extraktionsprozeduren lassen sich die Extraktionsmittel in eine Reihe fallender Extraktionsqualität für LCFA-CoAs aus Hefe-$HClO_4$-Niederschlag anordnen (in Klammern jeweils die in Tab.45 angegebene prozentuale Extraktionsausbeute):

Prozedur B: Pyridin:Isopropanol:Wasser = 1:1:2 (7o,3 %) >
> Pyridin:Wasser = 1:1 (61,5 %) >
> Pyridin:Isopropanol:Wasser = 1:1:1 (52,7 %);

Prozedur G: Pyridin:Isopropanol:Wasser = 1:1:2 (55,1 %) >
> Äthanol:1 N HCl = 1:1 (4,o %);

Prozedur H: Pyridin:Isopropanol:Wasser = 1:1:2 (6o,o ± 9,9 %) >
> Pyridin:Isopropanol:Wasser = 1:1:1 (57,9 %) >
> Pyridin:Wasser = 1:1 (49,4 %) >
> Äthanol:1 N HCl = 4:1 (31,3 %) >
> Äthanol:1 N HCl = 9:1 (17,7 %) >
> Äthanol:1o N HCl = 9:1 (11,2 %) >
> Äthanol:1 N HCl = 1:1 (6,o %) >
> Äthanol:1o N HCl = 4:1 (4,5 %) >
> Methylenchlorid:Methanol:c.HCl = 3o:1o:1 >
> Phenolum liquefactum (o,o %).

Die Reihenfolge der Extraktionsmittel stimmt im wesentlichen überein. In jeder Reihe steht "E2" (Pyridin:Isopropanol:Wasser = 1:1:2) an erster Stelle, aber auch die beiden anderen pyridinhaltigen Lösungsmittel (Pyridin:Isopropanol:Wasser = 1:1:1 und Pyridin:Wasser = 1:1) sind sehr gute Extraktionsmittel für unlösliches CoA, nicht dagegen auf pH 6 gepuffertes E2.

Für das Extraktionsmittel E2 lassen sich schließlich noch die nur wenig voneinander verschiedenen Extraktionsprozeduren B, H, I und J miteinander vergleichen. Bei diesen vier Prozeduren wird t(min) mit 5 ml Lösungsmittel verrieben und sodann n x 1 min lang mit Ultraschall behandelt, so daß sich jede Prozedur durch das Wertepaar (t;n) wiedergeben läßt. Die Extraktionsausbeuten mit E2 sind laut Tab.45:

für B (1;1) 7o,3 %,
für H (2;o) 6o,o ± 9,9 % (3),
für I (2;2) 76,8 %,
für J (2;1) 67,2 %.

Erhöhung von t bei konstantem n ergibt keinen nennenswerten Effekt (B → J), während Erhöhung von n bei konstantem t (H → J → I) die Extraktionsausbeute signifikant steigert.

In Tab.46 sind schließlich noch einige mit interner Eichung erhaltenen Werte aufgeführt. Sie stimmen im großen und ganzen mit den Werten aus Tab.45 überein; allerdings ist die prozentuale Extraktionsausbeute mit E2 (Prozedur B) mit 38,5 % deutlich geringer. Der Vergleich E2/Aceton fällt hier noch stärker zu Ungunsten des Acetons aus.

d) Aufstellung von Extraktionsbilanzen

Wegen der Unsicherheiten bei Extraktion, Aufschluß und CoA-Bestimmung mit dem kinetischen Test, namentlich bei externer Eichung, ist es zweckmäßig, zur Kontrolle nicht nur den Extrakt, sondern auch den Extraktionsrückstand aufzuschließen und zu testen und die beiden Werte für extrahiertes und nichtextrahiertes unlösliches CoA zu addieren. Die erhaltene Bilanzsumme muß dann ungefähr so groß sein wie der Gehalt von nichtextrahierter, am gleichen Tag aufgeschlossener Hefe an unlöslichem CoA ("Ausgangswert"). Für die Extraktion desselben Hefe-$HClO_4$-Niederschlags

mit verschiedenen Extraktionsmitteln muß die Bilanzsumme einigermaßen konstant sein. Daß diese beiden Forderungen im wesentlichen erfüllt werden, ist aus Tab.47 ersichtlich.

In Tab.48 sind die Extraktionsbilanzen für n-fache Extraktion von unlöslichem CoA aus Hefe-$HClO_4$-Niederschlag (Extraktionstyp I, s.5.1.2.) bzw. aus Hefe (Extraktionstyp II) mit ungepuffertem und auf pH 6 gepuffertem E2 aufgeführt. Für den in Tab.48 ebenfalls enthaltenen Fall n = o ist definitionsgemäß der Gehalt des Extrakts gleich Null und der Gehalt des Rückstands daher gleich der Bilanzsumme und gleich dem "Ausgangswert" von Tab.47. Für mehrmalige Extraktion ist zu erwarten, daß die bis zum n-ten Extraktionsschritt insgesamt extrahierte Menge an unlöslichem CoA mit steigendem n zunimmt, und zwar in Form einer Sättigungskurve, d.h.um so langsamer, je größer n wird, und daß sich die im Rückstand enthaltene Menge asymptotisch Null nähert. Die Bilanzsumme aus beiden Werten sollte im Idealfall für alle n konstant sein.

Alle diese Erwartungen werden durch die Versuchsergebnisse gut erfüllt. Bei bekanntem Ausgangswert kann daher die Menge des extrahierten unlöslichen CoA ohne Verseifung und damit verbundene Vernichtung eines Teils des Extraktes angenähert auch ermittelt werden, indem man den sowieso nicht mehr benötigten Extraktionsrückstand analysiert und die Differenz bildet. Wie schon in 6.5.2.c) erwähnt und mit Tab.48 wiederum bestätigt, ist auf pH 6 gepuffertes E2 im Vergleich zu E2 selbst ein schlechtes Extraktionsmittel. Durch E2 werden Hefe und Hefe-$HClO_4$-Niederschlag etwa gleich schnell extrahiert; bereits nach zweimaliger Anwendung von Prozedur B ist im Rückstand kaum noch unlösliches CoA enthalten.

Die Extraktion von löslichem CoA ist natürlich nur bei den Typ II-Extraktionen 2) und 4) zu verfolgen. Die Abnahme im Rückstand erfolgt sowohl mit E2 als auch mit E2 pH 6 sehr viel rascher als bei unlöslichem CoA; schon nach zweimaliger Extraktion ist im Rückstand kein lösliches CoA mehr meßbar.

Tab.47: Extraktionsbilanzen für 1-malige Extraktion von unlöslichem CoA aus Hefe-$HClO_4$-Niederschlag (Test b4 aus Tab.5; Eichung mit externem Standard, wo nichts anderes angegeben) (Extraktionsprozeduren s.6.5.1.)
x Äthanol-angereicherte Hefe, $HClO_4$-Niederschlag
y FPP 1-$HClO_4$-Niederschlag
i Eichung mit internem Standard

	Extraktionsmittel	Pro-zedur	Ausgangswert ≙ 1oo %	Rückstand		Extrakt		Bilanzsumme	
				nMol/gTG	in %	nMol/gTG	in %	nMol/gTG	in %
x	E2	H	26,2	1o,9	41,9	23,3	88,9	34,2	13o,5
x	E2	J	26,2	11,2	42,7	17,6	67,2	28,8	1o9,9
x	E2	H	29,1±2,2	7,2	24,7	14,8	5o,9	22,o	75,6
x	E2	H	34,5±2,4	16,2	47,o	17,7	51,3	33,9	98,3
x	E2	3xJ	54,4±6,3	o,6	1,1	35,3	64,9	35,9	66,o
x	E2	H	19,7±2,o	4,3	21,8	1o,7	54,3	15,o	76,1
	E2	B	17,6±o,2(3)	4,3	24,4	13,7	77,8	18,o	1o2,3
	E2	B	9,1±o,5(2)	3,1±o,4(2)	34,1	6,4±1,4(2)	7o,3	9,5	1o4,4
	Pyridin:Isopropanol:H_2O = 1:1:1	B	9,1±o,5(2)	3,o±o,9(2)	33,o	4,8±o,1(2)	52,7	7,8	85,7
	Pyridin:H_2O = 1:1	B	9,1±o,5(2)	2,7±o,8(2)	29,7	5,6±1,o(2)	61,5	8,3	91,2
y	E2	B	-	19,3	-	13,8	-	33,1	-
y	Aceton	B	-	25,6	-	1,5	-	27,1	-
y	Chloroform:Methanol = 2:1	B	-	41,8	-	1,8	-	43,6	-
y	Butanol:Eisessig:H_2O = 3:1:1	B	-	19,4	-	1o,2	-	29,6	-
i	E2	B	31,2±4,1(2)	22,4±2,3(2)	71,8	12,o±2,o(2)	38,5	34,4	11o,3
yi	Aceton	B	-	21,6	-	o,7	-	22,3	-

Tab.48: Extraktionsbilanzen für mehrmalige Extraktion von unlöslichem CoA (Prozedur B,s.6.5.1.; Test b4 aus Tab.5, Eichung mit externem Standard; alle Werte in nMol/g TG)

Material	Extraktionsmittel
1) Hefe-$HClO_4$-Niederschlag	E2
2) Hefe	E2
3) Hefe-$HClO_4$-Niederschlag	E2 + Eisessig ad pH 6
4) Hefe	E2 + Eisessig ad pH 6

Zahl der Extraktionen	o	1	2	3	4	5
1) Extrakt	o,o	7,1±2,o(3)	7,1±2,4(2)	7,9±2,4(3)	1o,1±3,9(2)	9,4±3,2(3)
Rückstand	1o,9±o,6(3)	2,3±o,7(3)	o,6±o,8(2)	1,1±1,3(3)	o,5±o,9(3)	o,2±o,4(3)
Bilanzsumme	1o,9±o,6(3)	9,5±1,6(3)	7,7±1,6(2)	9,o±3,6(3)	1o,1±3,9(2)	9,7±3,2(3)
2) Extrakt	o,o	5,9±2,1(2)	8,6±2,1(2)	12,9±1,3(2)	13,8±1,3(2)	14,4±o,4(2)
Rückstand	1o,6±o,4(2)	3,9±o,6(2)	2,o±o,8(2)	o,8±o,2(2)	o,7±o,1(2)	o,5±o,1(2)
Bilanzsumme	1o,6±o,4(2)	9,8±2,8(2)	1o,6±2,9(2)	13,7±1,5(2)	14,5±1,2(2)	14,9±o,5(2)
3) Extrakt	o,o	1,6	3,o	2,9	2,7	3,6
Rückstand	-	6,2	5,8	8,9	6,2	6,3
Bilanzsumme	-	7,8	8,8	11,8	8,9	9,9
4) Extrakt	o,o	o,1	o,o	o,1	o,o	o,2
Rückstand	-	7,3	9,5	1o,o	9,2	8,9
Bilanzsumme	-	7,4	9,5	1o,1	9,2	9,1

6.5.3. Verfolgung der Extraktion von LCFA-CoA-Verbindungen durch Zugabe von 1-^{14}C-PCoA

Die Extraktion von LCFA-CoA-Verbindungen läßt sich nicht nur mit Hilfe von Säureaufschluß und kinetischem Test verfolgen (s. 6.5.2.), sondern auch durch Zugabe von radioaktiv markiertem (i.a. 1-^{14}C-)PCoA und Radioaktivitätsmessung in den Extrakten. Die Extraktion von löslichem CoA, die sich mit dem kinetischen Test ebenfalls verfolgen läßt, könnte hier nur bei gleichzeitigem Zusatz von ^{3}H-CoA gemessen werden; auf eine Nachprüfung mit der radiochemischen Methode wurde daher verzichtet.

Mit biologischem Material können auch keine Extraktionsbilanzen wie in 6.5.2. aufgestellt werden, da auch kleine Aliquote von biologischen Extraktionsrückständen die Zählausbeute in Szintillationscocktails so stark vermindern, daß keine vernünftige Rückstandsmessung mehr möglich ist. Wird dagegen auf Whatman 1-Papier aufgetragenes PCoA extrahiert, so kann dieses direkt in der Szintillationsflüssigkeit gezählt werden, so daß die Berechnung einer Bilanzsumme möglich ist (s.Tab.49). Die Wiederfindungen liegen in allen Fällen bei 1oo % der eingesetzten Radioaktivität (Mittelwert aus 11 Extraktionsmitteln 98,1 $\pm$ 7,4 %).

Außerdem können - ähnlich wie in 6.5.2. - mehrere Extraktionsmittel in einer Reihenfolge angeordnet werden, die die Fähigkeit ausdrückt, LCFA-CoAs zu extrahieren. Führt man auch diesen Versuch mit Whatman 1-Papier statt mit biologischem Material aus, so erhält man die aus Tab.49 ersichtliche Reihenfolge bei Anordnung nach sinkender Radioaktivität im Extraktionsmittel. Eine Einreihung nach der auf dem Papier zurückgebliebenen Radioaktivität ergibt im wesentlichen die gleiche Reihenfolge.

Ein Vergleich mit den in 6.5.2. erhaltenen Reihenfolgen zeigt dieselbe bevorzugte Stellung der pyridinhaltigen Lösungsmittel; Chloroform-Methanol-Mischungen extrahieren PCoA aus Papier allerdings genauso gut oder sogar besser. Eine Erklärung für die unterschiedliche Fähigkeit von Chloroform-Methanol-Mischungen, LCFA-CoAs aus Papier bzw. aus biologischem Material zu extrahieren, liegt sicher in ihren denaturierenden und stark wasserentziehenden

Tab.49: Extraktionsbilanzen für Extraktion von 1-^{14}C-PCoA aus Whatman 1-Papier
(alle Werte in % der eingesetzten Ipm 1-^{14}C-PCoA)

Extraktionsmittel	Extrakt	Papier	Bilanzsumme
Chloroform:Methanol = 2:1	1o3,7	5,o	1o8,7
E2	97,5	9,2	1o6,7
Chloroform:Methanol:Eisessig = 1o:2o:3	85,1	18,3	1o3,4
Pyridin:Isopropanol:Wasser = 1:1:1	84,o	18,7	1o2,7
Äthanol:1 N HCl = 9:1	78,8	8,3	87,1
E2 + Eisessig ad pH 6	69,3	23,5	92,8
Wasser	38,9	61,9	1oo,8
o,1 M Natriumacetat-Puffer pH 5,2	14,7	71,1	85,8
Äthanol:Äther = 3:1	8,8	88,6	97,4
Petroläther	1,o	93,9	94,9
Toluol	o,8	98,o	98,8

Eigenschaften: Biologisches Material, besonders wenn es nicht lyophilisiert worden ist, bildet in Chloroform-Methanol-Mischungen oft eine kittartige Masse, die sich nur noch schwer weiter extrahieren läßt.

In Tab.5o sind noch Extraktionen (ohne Bilanzbildung; Prozedur B) von zugesetztem 1-^{14}C-PCoA aus Kieselgel (für Trockensäulenchromatographie), Hefe (bzw.FPP 1), Hefe- (bzw.FPP 1-)$HClO_4$-Niederschlag sowie Schweineleber-Lyophilisat angeführt. E2 extrahiert 1-^{14}C-PCoA aus Kieselg l, FPP 1 und Schweineleber-Lyophilisat etwa gleich gut (etwa zu 5o %), aus Hefe- und FPP 1-$HClO_4$-Niederschlag wesentlich schlechter (etwa zu 3o %). Chloroform: :Methanol = 2:1 extrahiert aus Schweineleber-Lyophilisat nur etwa zu 4o %; dieser Wert stimmt mit dem in 6.5.2. für die Extraktion von FPP 1 erhaltenen überein.

6.5.4. Verfolgung der Extraktion freier Fettsäuren durch Zugabe von 1-^{14}C-Palmitinsäure

Ebenso wie die Extraktion von LCFA-CoA-Verbindungen in 6.5.3., so läßt sich auch die Extraktion freier Fettsäuren radiochemisch

Tab.5o: Extraktion von 1-^{14}C-PCoA (Prozedur B, s.6.5.1.)
(alle Werte in % der eingesetzten Ipm 1-^{14}C-PCoA)

Material	Extraktionsmittel	Zahl der Extraktionen 1	2	3	4
Kieselgel	Pyridin:Isopropanol:Wasser = 1:1:2 (E2)	52,7	73,7	79,4	-
Schweineleber-Lyophilisat	Chloroform:Methanol = 2:1	41,o	47,5	5o,3	52,4
	Pyridin:Isopropanol:Wasser = 1:1:2 (E2)	53,o	59,8	62,2	64,3
FPP 1	Pyridin:Isopropanol:Wasser = 1:1:2 (E2)	5o,o	68,o	78,8	85,6
Hefe-$HClO_4$-Niederschlag	Pyridin:Isopropanol:Wasser = 1:1:2 (E2)	29,2	51,7	-	-
	Pyridin:Isopropanol:Wasser = 1:1:2 (E2)	32,5	43,7	-	-
FPP 1-$HClO_4$-Niederschlag	Pyridin:Isopropanol:Wasser = 1:1:2 (E2)	3o,6	43,9	53,5	59,2
Schweineleber-Lyophilisat	Chloroform	16,5	2o,7	23,o	-
	Chloroform:Methanol = 9:1	31,5	34,6	35,5	-
	Chloroform:Methanol = 8:2	29,2	33,4	36,2	-
	Chloroform:Methanol = 7:3	3o,9	33,9	35,3	-
	Chloroform:Methanol = 6:4	22,8	26,4	27,9	-
	Chloroform:Methanol = 5:5	26,3	31,4	34,5	-
	Chloroform:Methanol = 4:6	19,4	23,1	24,9	-
	Chloroform:Methanol = 3:7	14,6	16,5	17,5	-
	Chloroform:Methanol = 2:8	18,8	22,8	24,8	-
	Chloroform:Methanol = 1:9	14,5	18,3	2o,7	-
	Methanol	14,o	18,1	2o,8	-

verfolgen, indem man zu Beginn der Extraktion 1-^{14}C-Palmitinsäure zugibt (evtl. zusammen mit unmarkierter Träger-Palmitinsäure). Der Zweck dieser Untersuchungen lag einmal in der Anwendung auf die Reinigung von synthetisch hergestelltem 1-^{14}C-PCoA von überschüssiger 1-^{14}C-Palmitinsäure (s.3.4.2.), aber auch auf die Entfernung von nachträglich - etwa durch Thioesteraseeinwirkung - aus 1-^{14}C-PCoA in Extrakten aus biologischem Material entstandener 1-^{14}C-Palmitinsäure. Außerdem kann 1-^{14}C-Palmitinsäure auch als Prototyp der Klasse der Neutrallipide angesehen werden; das heißt wenn es gelungen ist, 1-^{14}C-Palmitinsäure aus einer Probe oder einem Extrakt zu entfernen, kann man davon ausgehen, daß auch der größte Teil der Neutrallipide mit entfernt wurde (s.5.2.1.).

Wie in 6.5.3. wurde zunächst aus Whatman 1-Papier extrahiert, um Extraktionsbilanzen aufstellen zu können (s.Tab.51). Die Wiederfindungen liegen bei fast allen verwendeten Extraktionsmitteln - mit der Ausnahme von Wasser - bei 1oo % der eingesetzten Radioaktivität (Mittelwert aus 1o Extraktionsmitteln 98,4 $\pm$ 7,2 %). Eine Anordnung in Extraktionsreihen wie bei ^{14}C-PCoA ist hier kaum sinnvoll, weil die meisten verwendeten Extraktionsmittel 1-^{14}C-Palmitinsäure fast vollständig extrahieren. Lediglich bei einer Gruppe von neutralen und wäßrigen Extraktionsmitteln bleiben etwa 6o % der eingesetzten Radioaktivität im Papier (auf pH 6 eingestelltes E2; o,1 M Natriumacetat-Puffer pH 5,2; Wasser).

In Tab.52 sind Extraktionen von 1-^{14}C-Palmitinsäure aus biologischem Material angeführt. Petroläther, Chloroform-Methanol-Mischungen sowie E2 extrahieren Palmitinsäure aus Hefe und Leber gut, aber nicht so vollständig wie aus Papier; nur mit Aceton wird schon beim erstenmal 9o%ige Extraktion erreicht. Aus $HClO_4$-Niederschlägen extrahieren E2 und Petroläther ziemlich schlecht, letzterer wohl wegen der mangelnden Benetzung des wasserhaltigen Niederschlags (vgl.3.4.2.). Aceton extrahiert Palmitinsäure auch aus $HClO_4$-Niederschlägen gut (in Tab.52 nicht aufgeführt; s.5.2.1.).

Tab.51: Extraktionsbilanzen für Extraktion von 1-^{14}C-Palmitinsäure aus Whatman 1-Papier
(alle Werte in % der eingesetzten Ipm 1-^{14}C-Palmitinsäure)

Extraktionsmittel	Extrakt	Papier	Bilanzsumme
Chloroform:Methanol = 2:1	1o9,6	2,o	111,6
E2	1oo,2	4,5	1o4,7
Äthanol:1 N HCl = 9:1	97,8	3,1	1oo,9
Toluol	96,9	3,5	1oo,4
Pyridin:Isopropanol:Wasser = 1:1:1	96,2	3,2	99,4
Chloroform:Methanol:Eisessig = 1o:2o:3	96,1	2,7	98,8
Äthanol:Äther = 3:1	94,8	2,5	97,3
Petroläther	83,8	11,2	95,o
E2 + Eisessig ad pH 6	29,9	59,8	89,7
o,1 M Natriumacetat-Puffer pH 5,2	21,3	64,9	86,2
Wasser	4,5	63,4	(67,9)

6.5.5. Extraktion von Verunreinigungen

a) Extraktion von Trockenmasse

In Tab.53 ist die Extraktion von Trockenmasse aus verschiedenen Hefe-Präparationen mit verschiedenen Extraktionsmitteln dargestellt. Mit typischen Lipid-Lösungsmitteln wie Chloroform oder Chloroform:Methanol = 2:1 wird nur wenig Trockenmasse extrahiert (nur Neutrallipide bzw.Gesamtlipid), mit Äthanol:Äther = = 3:1 sowie mit den LCFA-CoA-Lösungsmitteln Pyridin:Isopropanol: :Wasser = 1:1:2 und = 1:1:1 dagegen viel Trockenmasse, besonders aus den entsprechenden $HClO_4$-Niederschlägen. Da aus Hefe-$HClO_4$-Niederschlag mit E2 jedoch nur wenig Protein extrahiert wird (s.6.5.5.b)), handelt es sich bei dem größten Teil der extrahierten Trockenmasse, die rechnerisch immerhin mehr als 5o % der eingesetzten Hefe-Trockenmasse ausmachen kann, wahrscheinlich um Salze, insbesondere um Pyridiniumperchlorat.

Tab.52: Extraktion von 1-^{14}C-Palmitinsäure (Prozedur B, s.6.5.1.)
(alle Werte in % der eingesetzten Ipm 1-^{14}C-Palmitinsäure)

Material	Extraktionsmittel	Zahl der Extraktionen 1	2	3	4	5
Hefe	Pyridin:Isopropanol:Wasser = 1:1:2 (E2)	4o,2	58,5	67,9	73,9	-
FPP 1	Petroläther	59,4	76,6	83,6	87,6	-
	Pyridin:Isopropanol:Wasser = 1:1:2 (E2)	53,7	67,6	71,3	-	-
	Pyridin:Isopropanol:Wasser = 1:1:2 (E2)	68,4	85,8	9o,4	93,5	94,2
FPP 3	Pyridin:Isopropanol:Wasser = 1:1:2 (E2)	53,3	82,3	95,5	1o3,9	-
	Aceton	89,5	1o1,1	1o4,8	-	-
Mauseleber	Pyridin:Isopropanol:Wasser = 1:1:2 (E2)	52,6	81,7	93,8	96,8	-
	Pyridin:Isopropanol:Wasser = 1:1:2 (E2)	42,6	65,8	75,3	78,2	-
Schweineleber-Lyophilisat	Chloroform	51,o	74,1	84,9	-	-
	Chloroform:Methanol = 9:1	63,o	96,5	1o5,9	-	-
	Chloroform:Methanol = 8:2	47,9	78,6	9o,9	-	-
	Chloroform:Methanol = 7:3	57,9	87,8	1o2,2	-	-
	Chloroform:Methanol = 6:4	65,8	83,1	89,4	-	-
	Chloroform:Methanol = 5:5	64,6	89,2	96,7	-	-
	Chloroform:Methanol = 4:6	73,3	95,6	1o2,9	-	-
	Chloroform:Methanol = 3:7	6o,5	8o,7	87,5	-	-
	Chloroform:Methanol = 2:8	61,2	83,6	91,6	-	-
	Chloroform:Methanol = 1:9	65,3	84,o	92,7	-	-
	Methanol	54,1	75,8	87,9	-	-
Hefe-$HClO_4$-Niederschlag	Pyridin:Isopropanol:Wasser = 1:1:2 (E2)	2,5	5,7	-	-	-
	Pyridin:Isopropanol:Wasser = 1:1:2 (E2)	2,3	5,9	8,1	9,2	-
	Pyridin:Isopropanol:Wasser = 1:1:2 (E2)	1,3	3,o	4,4	5,2	-
FPP 1-$HClO_4$-Niederschlag	Pyridin:Isopropanol:Wasser = 1:1:2 (E2)	5,1	14,8	25,1	33,8	-
	Petroläther	6,8	8,5	-	-	-

Tab.55: Extraktion von Trockenmasse aus Hefe (Prozedur B, s.6.5.1.)
(alle Angaben in mg extrahierter Trockenmasse/g TG)

Material	NG(g)	TG(g)	Extraktionsmittel	Zahl der Extraktionen 1	2	3	4	5
PF 1	1	1	Chloroform	16,4	-	-	-	-
	1	1	Chloroform:Methanol = 2:1	28,6	-	-	-	-
	1	1	E2	119,9	-	-	-	-
Hefe	2	o,5912	Pyridin:Isopropanol:Wasser = 1:1:1	153,4	178,1	194,7	2o2,8	21o,1
	2	o,5912	E2	1o1,3	122,4	131,6	139,4	142,5
	2	o,6195	E2	196,5±1o,4(4)	-	-	-	-
	2	0,56o7	E2	2oo,o± 1,o(4)	-	-	-	-
Hefe-TCA-Niederschlag	1	o,2954	Äthanol:Äther = 3:1	154,2	172,6	178,3	183,4	187,9
Hefe-$HClO_4$-Niederschlag	2	o,5693	Pyridin:Isopropanol:Wasser = 1:1:1	333,8	394,8	4o3,3	411 5	411,6
	2	o.5879	E2	375,1	416,1	429,8	438,2	444,3
	2	o 6o94	Pyridin:Isopropanol:Wasser = 1:1:1	581,7	623,2	632,6	637,1	64o,3

b) Extraktion von Protein

Tab.54 zeigt das Ausmaß der Extraktion von Protein mit Lipid- und LCFA-CoA-Lösungsmitteln. In Chloroform-Methanol-Extrakten ist kaum Protein enthalten, in E2-Extrakten aus nicht säuregefälltem Material dagegen größenordnungsmäßig so viel wie der gesamte Lipidgehalt. Es handelt sich nicht um gröbere Proteinflocken, sondern um völlig gelöstes Protein, was aus einem Versuch hervorgeht, in dem ein FPP 1-E2-Extrakt mit 6,71 mg Gesamtproteingehalt filtriert wurde: Nach der Filtration war der Proteingehalt mit 6,7o mg praktisch unverändert. E2-Extrakte sind auch optisch vollkommen klar.

Bei der weiteren Aufarbeitung und Reinigung der E2-Extrakte muß das Protein jedoch so vollständig wie möglich abgetrennt werden, da es bei Behandlung mit Lipid-Lösungsmitteln (z.B.bei Zugabe von Chloroform:Methanol = 2:1 zu gegen Wasser dialysiertem E2-Extrakt zum Zwecke der Folchverteilung) oder mit Säure als klebrige Masse ausfällt und dabei die LCFA-CoAs mit sich reißt. Der Proteingehalt kann von vornherein geringer gehalten werden, wenn man vor der E2-Extraktion mit $HClO_4$ oder mit Aceton behandelt (s.Tab.54). Durch diese Prozedur verliert man nur wenig LCFA-CoA; das meiste Protein denaturiert dabei jedoch irreversibel, so daß es nicht mehr in E2 auflösbar ist. Der Proteingehalt steigt allerdings wieder, wenn man zur Erhöhung der Ausbeute öfters mit E2 extrahiert.

Die Mitextraktion von Protein kann auch vermieden werden, indem man andere Extraktionsmittel als E2 wählt, die wenig oder kein Protein, aber viel LCFA-CoA extrahieren. Besonders geeignet sind Methanol und Butanol:Eisessig:Wasser = 5:2:3, die in einem Kontrollversuch 58,5 % bzw. 25,2 % von zu FPP 3 zugesetztem 1-^{14}C-PCoA extrahierten, aber kaum Protein. Bedingt ist auch das Lipidextraktionsmittel Chloroform:Methanol = 2:1 brauchbar.

c) Extraktion von Phosphat

Wir bestimmten anorganisches, Gesamt- und Lipid-Phosphat nach den Vorschriften (119,211,212), die im Prinzip alle auf der Reduk-

Tab.54: Extraktion von Protein (Prozedur B, s.6.5.1.)
(alle Angaben in mg Protein/g TG)

Material	NG(g)	TG(g)	Extraktionsmittel	Extrakt
FPP 1	1	1	E2	8,9
FPP 3	1	1	E2	13,5
FPP 3-$HClO_4$-Niederschlag	1	1	E2	1,2
FPP 3-Aceton-Niederschlag	1	1	E2	o,o
Schweineleber-Lyophilisat	1	1	E2	5,5
	1	1	Chloroform:Methanol = 2:1	o,2

tion des gelben Ammoniumphosphomolybdatkomplexes mit Hilfe von $NaHSO_3$ bzw. $Na_2S_2O_5$, Na_2SO_3 und 1-Amino-Naphthol-2-sulfonsäure-4 zu einer blauen Verbindung und deren Extinktionsmessung bei 83o nm beruhen und sich ansonsten nur in Details unterscheiden.

FPP 7 enthält nach unseren Messungen in 1 mg 75,3 nMol anorganisches Phosphat und 24,8 nMol Lipidphosphat; d.h.Phospholipide sind etwa um den Faktor $1o^3$ stärker vertreten als die Fraktion der LCFA-CoA-Verbindungen.

Tab.55 zeigt den Verlauf der Extraktion von anorganischem und Gesamtphosphat aus Hefe und die Verteilung des Phosphats auf die einzelnen Extrakte. Im Gegensatz zu den Extraktionskurven für die Gesamt-Trockensubstanz, für LCFA-CoAs und für anorganisches Phosphat, die i.a.die Form von Sättigungskurven haben, flacht die Kurve für Extraktion von Gesamt-Phosphat mit Äthanol:Äther = 3:1 nur langsam ab; d.h. auch bei mehr als 5 Extraktionen werden noch beträchtliche Mengen Gesamt-Phosphat extrahiert. Bei derselben Kurve beobachteten wir auch eine Verzögerungsphase bei der Extraktion von Gesamtphosphat. Bei der 1.Extraktion sind erst 4,9 % des Gesamtphosphats, aber schon 67 % des anorganischen Phosphats freigesetzt. Der Gehalt an anorganischem und Gesamt-Phosphat pro mg Extrakt erreicht bei

Tab 55: a) Extraktion von anorganischem und Gesamt-Phosphat aus Hefe (Prozedur B, s.6.5.1.)
(alle Angaben in µMol Phosphat/g TG Hefe)

b) Verteilung des anorganischen und Gesamt-Phosphats auf die Extrakte
(alle Angaben in nMol Phosphat/mg Extrakt)

Material	Extraktionsmittel	Phosphat	Zahl der Extraktionen 1	2	3	4	5
a) Hefe	Wasser	anorg.	1o7,3	-	-	-	-
	o,6 N $HClO_4$	anorg.	157,6	-	-	-	-
	E2	anorg.	6o,6	-	-	-	-
	Wasser	Gesamt-	122,4	-	-	-	-
	o,6 N $HClO_4$	Gesamt-	171,8	-	-	-	-
	E2	Gesamt-	8o,2	-	-	-	-
a) Hefe-TCA-Niederschlag	Äthanol:Äther = 3:1	anorg.	2,2	2,8	3,o	3,2	3,3
	Äthanol:Äther = 3:1	Gesamt-	2,6	17,2	32,3	43,5	52,8
a) Hefe-$HClO_4$-Niederschlag	E2	Gesamt-	17,6	21,1	23,7	25,3	26,8
b) Hefe-TCA-Niederschlag	Äthanol:Äther = 3:1	anorg.	14,4	32,8	36,4	36,1	21,2
	Äthanol:Äther = 3:1	Gesamt-	16,9	79o,7	2683,4	218o,2	2o52,6
b) Hefe-$HClO_4$-Niederschlag	E2	Gesamt-	46,8	86,2	19o,9	191,o	243,o

der 3. und 4.Extraktion mit Äthanol:Äther = 3:1 ein Maximum und fällt dann wieder ab. Bei Extraktion mit E2 nimmt der Gesamtphosphatgehalt pro mg Extrakt dagegen mindestens bis zur 5.Extraktion noch zu; wegen der Mitextraktion von Protein allerdings auf wesentlich niedrigerem Niveau.

6.5.6. Lipidzusammensetzungen

7 bis 15 % der Hefe-Trockenmasse bestehen aus Lipiden (174); 4 % des Trockengewichts (bei Saccharomyces cerevisiae) bzw. 5 % (bei Candida lipolytica) sind Phospholipide. Betrachtet man einzelne Organellen statt ganzer Zellen, so stößt man oft auf völlig abweichende Zahlden: Hefe-Mitochondrien enthalten z.B. 25,4 % Lipide und 12,8 % Phospholipide.

Tab.56 zeigt Literaturdaten über die Zusammensetzung der Phospholipid-Fraktionen aus verschiedenen Spezies und Organen. Kleinere Abweichungen werden sogar von ein und demselben Autor für dieselbe Spezies und dasselbe Organ angegeben. In keinem Fall läßt sich ohne weiteres von der Zusammensetzung eines bestimmten Probematerials auf die eines anderen schließen, da sowohl Spezies-, Organ- als auch Organell-Anomalitäten auftreten.

Besonders extrem sind die Speziesanomalitäten bei Mikroorganismen. Escherichia coli enthält nur 3 Phospholipidarten (PE, DPG und PG), die noch dazu in anderen Spezies nur eine untergeordnete Rolle spielen. In den meisten Fällen ist dort PC die Hauptkomponente, dann folgen PE, PI und PS. Hefen enthalten im Gegensatz zu höheren Organismen keine Plasmalogene, kein SM und keine Ganglioside; Cerebroside sind die einzigen vorhandenen Sphingolipide. Dafür enthalten sie sonst kaum vorkommende Lipide wie N-Methyl-PE, N,N-Dimethyl-PE, PG-Phosphat; außerdem gerad- und verzweigtkettige Kohlenwasserstoffe sowie mehrere Prozent FFA. Statt dem gängigen Sterol Cholesterol enthalten sie Ergosterol, das auch Bestandteil der Hefe-Sterolester ist. Bei höheren Organismen ist die Lipidzusammensetzung gleichförmiger (s.den Vergleich zwischen Ratten- und Menschenleber in Tab.56); so haben z.B. die Skelettmuskeln aller Vertebraten etwa die gleiche Phospholipidzusammensetzung. Auch hier gibt es jedoch zuweilen

Tab 56: Lipidzusammensetzungen (in % des Gesamt-Lipidphosphats)
- ≙ keine Angaben; + ≙ Vorhandensein nur qualitativ festgestellt

Literatur	Spezies/Organ	PC	PE	PI	PS	DPG	PG	PA	SM	Lyso-
(166)	Escherichia coli	-	82	-	-	11	7	-	-	-
(213)	Candida lipolytica	55	ca.25	9	5	-	-	-	-	-
(213)	Saccharomyces cerevisiae	ca.4o	ca.23	22	4	+	+	-	-	LPC +
(214)	Hefe	35-55	2o-32	9-22	4-18	+	+	+	-	LPC 11? LPE 8?
(174)	Hefe	35-5o	14-35	8-23	4-2o	-	-	-	-	-
(174)	Hefe, stationär	46,4	14,9	12,7	9,5	7,5	+	+	-	LPC + LPE +
(174)	Hefe, Guiness1164	42,5	22,6	2o,9	7,2	2,5	-	-	-	-
(174)	Hefe, CBS 712	44	24	21	11	-	-	-	-	-
(174)	Hefe, ganze	55	2o	15	bei PI	-	-	-	-	-
	Zellen	45,2	16,7	19,8	9,3	-	-	-	-	-
(13o)	Rattenleber	46,7-5o,4	22,1-24,9	7,8-8,9	2,8-3,8	3,6-4,7	o,1--o,5	o,1--o,6	3,8--4,4	LPC o,5-1,3 LPE o,4 LPA o,1-o,4
(41)	Rattenleber	5o,8	25,2	7,2	3,2	4,8	-	o,4	4,6	LPC 1,4 LPI o,4 LPS o,2
(41)	Menschenleber	43,6	27,9	8,6	3,1	3,7	-	o,7	4,2	LPC 1,3

Überraschungen; PG, das in fast allen Säugetierlebern nur mit o,1 % oder wenig mehr vertreten ist, kommt in Schafleber zu 3,5 % vor.

Innerhalb der gleichen Spezies kommt es zu Organanomalitäten. Herzmuskel enthält immer überdurchschnittlich viel DPG, Schafherz außerdem noch viel CP. Dagegen enthält Schafhirn viel EP.

Bleibt man bei der gleichen Spezies und beim gleichen Organ, z.B.bei Rattenleber, so beobachtet man schließlich noch Unterschiede bei den einzelnen Organellen. Während etwa die innere Mitochondrienmembran sehr viel DPG und wenig SM enthält, ist es bei Plasmamembranen gerade umgekehrt. Auch Golgikörper und Lysosomen enthalten anomal viel SM.

6.5.7. Dünnschichtchromatographie von Lipiden

Das Mittel der Wahl zur Bestimmung der Lipidzusammensetzung in Extrakten ist die dünnschichtchromatographische Auftrennung. Die gängigsten Dünnschicht-Laufmittel für Neutrallipide und polare Lipide sind in Tab.57 aufgeführt. Der Trennvorgang beruht bei Neutrallipiden im wesentlichen auf Adsorptionsvorgängen am Kieselgel, bei polaren Lipiden auf der Einstellung eines Verteilungsgleichgewichts zwischen einer stationären und einer mobilen Phase. Polare Lipide sowie LCFA-CoAs bleiben in den für die Auftrennung von Neutrallipiden geeigneten Laufmitteln am Start, während Neutrallipide in den für polare Lipide angegebenen Laufmitteln meist zur Front laufen (vgl.das Dünnschicht-Verhalten von 1-^{14}C-Palmitinsäure in Tab.18).

Um eine Vorstellung von der Verteilung der Lipide auf der Platte nach der Entwicklung zu geben, seien die in (127) angegebenen Rf-Werte für das gängigste Neutrallipidlaufmittel (A; Petroläther:Äther:Eisessig = 9o:1o:1) und für das gängigste Phospholipidlaufmittel (B; Chloroform:Methanol:Wasser = 65:25:4) aufgeführt (Tab.58).

Weitere Rf-Werte von Lipiden bei eindimensionaler und zweidimensionaler Dünnschichtchromatographie sind in (41,117,215)

Tab.57: Laufmittelsysteme für die Dünnschichtchromatographie von Lipiden (jeweils verschiedene Verhältnisse)

A. Eindimensionale Dünnschichtchromatographie:

I. Neutrallipide:

(216)	Äther
(2o3,217)	Petroläther-Äther
(88,2o6,217 bis 222)	Petroläther-Äther-Eisessig
(31)	n-Hexan-Äther-Eisessig
(31,1o8)	n-Heptan-Diisopropyläther-Eisessig
(31)	n-Hexan-Äther-Methanol-Eisessig

II. Polare Lipide:

(223)	Butanol-Pyridin-Wasser
(2o3)	Benzol-Chloroform-Methanol
(31,117,14o,2o8,217,221, 224)	Chloroform-Methanol-Wasser
(14o,2o3,2o8,218,219,225, 226)	Chloroform-Methanol-NH_3
(2o8,225)	Chloroform-Methanol-Eisessig
(31)	Benzol-Äther-Äthanol-Eisessig
(88,14o,2o3,2o6,218,221)	Chloroform-Methanol-Eisessig-Wasser
(2o3)	Chloroform-Methanol-Ameisensäure-HCl

B. Zweidimensionale Dünnschichtchromatographie:

(92,117,13o,215)	1) Chloroform:Methanol:Wasser = 65:25:4 2) Butanol:Eisessig:Wasser = 3:1:1
(92,13o)	1) Chloroform:Methanol:28 % NH_3 = 13:5:1 2) Chloroform:Aceton:Methanol:Eisessig: :Wasser = 6:8:2:2:1
(92,117,13o,215)	1) Chloroform:Methanol:28 % NH_3 = 13:7:1 2) Chloroform:Aceton:Methanol:Eisessig: :Wasser = 1o:4:2:2:1

Tab.58: Verteilung der Lipide bei Dünnschichtchromatographie in den Laufmitteln A und B (127)

1) Laufmittel A:	Rf-Wert
Kohlenwasserstoffe	1,o
Sterolester	o,9
Wachse, Diacylglycerinmonoäther	o,7
Methylester, Aldehyde	-
TG	o,5
FFA	o,25
Alkohole, DG, Sterole, Fettsäure-Salze	-
Monoglyceride, Phospholipide, Glykolipide	Start
2) Laufmittel B:	
DPG, PA, Cerebroside	o,6
EP, PE, PG	o,45
CP, Sulfolipide	o,3
PC, PS, LPE	o,2
PI, SM	o,1
LPC	o,o5
LPS, Ganglioside	Start

*Anmerkung: LCFA-CoAs bleiben in beiden Laufmitteln am Start (s.Tab.12).

angegeben. Für Routineanalysen genügt eindimensionale Dünnschichtchromatographie; für die Analyse sehr komplexer Mischungen sowie für die Auffindung von Spurenkomponenten (s.5.1.3.a)) ist dagegen zweidimensionale Chromatographie vorteilhaft. In Tab.57 sind einige dafür empfohlende Laufmittelsysteme angeführt.

Für die Detektion von Lipiden auf Dünnschichtplatten stehen zahlreiche spezifische und unspezifische Sprühmittel zur Verfügung. Die von uns am häufigsten verwendeten unspezifischen Sprühmittel sind Phosphomolybdänsäure und Kägi-Miescher-Mischung (s.6.1.4.), außerdem I_2-Dampf, Bromthymolblau, Rhodamin B und 6G, Fluorescein, 2',7'-Dichlorfluorescein sowie $K_2Cr_2O_7$ in H_2SO_4. Die aggressiveren dieser Sprühmittel lassen sich natürlich nur für Kieselgel-Glasplatten verwenden (nicht für Cellulose und

auch nicht für Dünnschicht-Alufolien). Zahlreiche Lipide löschen auch die Fluoreszenz auf Kieselgel-F254-Platten, so daß die Dünnschichtchromatogramme am besten vor dem Besprühen im UV-Licht betrachtet werden. Dies ist insbesondere für den Nachweis von LCFA-CoAs in Lipidextrakten nötig, da die Nachweisgrenze durch Fluoreszenzlöschung wesentlich unter der mit Lipidsprühmitteln liegt und somit noch Mengen von LCFA-CoAs erkannt werden können, die bei Besprühen mit Kägi-Miescher-Mischung unsichtbar bleiben (s.3.2.3.).

Schließlich gibt es noch spezifische Sprühmittel für jede Lipidklasse (216,218), von denen wir jedoch nur das Ninhydrin-Sprühmittel für aminogruppenenthaltende Lipide (PE, PS und deren Lysoderivate) verwendeten. Ansonsten identifizierten wir die Lipide durch Mitlaufenlassen von reinen Vergleichssubstanzen bei eindimensionaler Dünnschichtchromatographie bzw. durch die relative Lage in dem bei zweidimensionaler Dünnschichtchromatographie entstehenden Muster (s.5.1.3.).

Die in Tab.57 für die Auftrennung der polaren Lipide genannten NH_3-haltigen Laufmittel sind für LCFA-CoAs wegen der Hydrolysegefahr nicht geeignet; in den meisten anderen aufgeführten Laufmitteln (z.B. A und B, s.Tab.58) bleiben LCFA-CoAs am Start. Eine Ausnahme bilden nur Laufmittel C, E und M (s.Tab.12). Da Laufmittel M (Propanol:Wasser = 7:3) aber wiederum nur beschränkt für die Dünnschichtchromatographie von Lipiden brauchbar ist - laut (92) wird diese Mischung hauptsächlich für Substanzen mit mehr als 15 Hydroxylgruppen, also Ganglioside, verwendet - bleiben nur noch Laufmittel C und E übrig.

Eine ganze Reihe der in Tab.57 genannten Laufmittel für die Auftrennung von Neutrallipiden und polaren Lipiden in eindimensionaler Dünnschichtchromatographie (und HPTLC) wurde von uns mit käuflichen Lipidstandards getestet; da die Verteilung der Flecke auf der Dünnschichtplatte in den meisten Fällen in etwa mit den Literaturangaben für die Rf-Werte übereinstimmte, sei hier auf eine genaue Wiedergabe der Ergebnisse verzichtet. Wegen unvermeidbarer Variabilität in den Chromatographiebedingungen sind die Rf-Werte auch nie völlig reproduzierbar, so daß eine zweifelsfreie Identifizierung einer bestimmten Lipidkomponente

sowieso nur durch Mitlaufenlassen der authentischen Vergleichssubstanz und/oder durch Verwendung eines spezifischen Sprühreagens gelingt. Zur Orientierung seien lediglich die Reihenfolgen der Flecke in Richtung steigender Rf-Werte für die gängigsten Laufmittel für polare Lipide und LCFA-CoAs angegeben:

Laufmittel B: LCFA-CoA, Ganglioside (Start) < SM < PS < PA, PC < < DPG, PG < PE

Laufmittel C: LCFA-CoA < PC < PE, PA < PG, DPG

Laufmittel E: Ganglioside, SM < LCFA-CoA < PC, PS < PE, PG, DPG < PA

Die Reihenfolge in Laufmittel B wich bei uns etwas von der in Tab.58 angegebenen ab. In Laufmittel C und E blieb keine der aufgetragenen Verbindungen am Start. PC befand sich in allen 3 Laufmitteln etwa in der Mitte (Rf o,5). In Laufmittel E kommt es schon bei geringfügiger Überladung mit SM oder Gangliosiden leicht zu "tailing" unterhalb der ß-Front.

6.5.8. Umsetzung von Phospholipiden mit Phospholipase C

Lösung von ca.2o mg Phospholipiden (entweder rein oder aus eingeengtem Extrakt) pro ml H_2O herstellen (Sonifier, Mikrospitze)
davon 1oo µl in Eppendorf-Cap
+ 1oo µl Puffer pH 7,5 (o,1 M Triäthanolamin, 2o mM $CaCl_2$)
+ 1o µl ≙ 2o µg Phospholipase C aus Bacillus cereus (2 mg/ml-Suspension)

Nach 3o bis 6o min bei Raumtemperatur ist die Reaktion vollständig.

7. Zusammenfassung

1) Es werden verschiedene Bestimmungsmethoden für Coenzym A miteinander verglichen. Mit mehreren Tests werden Stabilitäts-Eigenschaften von Coenzym A untersucht. Genauer werden behandelt:

a) die Phosphotransacetylase-Endwertmethode,

b) die Phosphotransacetylase/Citratsynthase/Malat-Dehydrogenase-Methode, die mit und ohne Hemmung durch Ionen und organische Lösungsmittel untersucht wird und für die Grenzbedingungen für die Eichung mit externem und mit internem Standard hergeleitet werden,

c) die Phosphotransacetylase/Arsenolyse/Hydroxamsäure-Methode, die durch Veränderung mehrerer Parameter optimiert wird.

2) Mehrere Bestimmungsmethoden für langkettige Acyl-Coenzym A-Thiolester werden miteinander verglichen, und zwar solche ohne und mit Spaltung der Thiolesterbindung (unter anderem alkalische Hydrolyse mit anschließender enzymatischer oder nichtenzymatischer Coenzym A-Bestimmung, Differenzspektrenmethode). Der mit verschiedenen Tests gemessene zeitliche Verlauf der Verseifung wird diskutiert und die "Halbwertszeit der Inaktivierung" bestimmt (zwischen 53 und 7o sec bei 3o bis 37°C). Die UV-spektroskopischen, Micellen-, Detergens-, Löslichkeits- und Phasenverteilungs- sowie dünnschicht- und säulenchromatographischen Eigenschaften der langkettigen Acyl-Coenzym A-Verbindungen werden bestimmt und Verfahren für ihre Synthese und Reinigung angegeben. Ferner werden Möglichkeiten zur Unterscheidung von den entsprechenden Dephospho-Coenzym A-Verbindungen diskutiert.

3) Es wird eine Aufschlußmethode zur getrennten Bestimmung von "löslichem" und "unlöslichem Coenzym A" angegeben und mit ihrer Hilfe die Gehaltswerte von Hefe- und Leberpräparationen gemessen. Die Normalwerte für "unlösliches CoA" (etwa gleichbedeutend mit dem Gehalt an langkettigen Acyl-Coenzym A-Verbindungen) betragen: 3o bis 4o nMol/g Trockenmasse für Bäckerhefe,
6o bis 12o nMol/g Trockenmasse für Schweineleber,
4o bis 5o nMol/g Feuchtgewicht für Rattenleber.
Bei 48-stündigem Fasten von Ratten steigen sie etwa um den Faktor 2,3 bis 2,7. Bei Inkubation von Hefe bei 3o°C in destilliertem Wasser ("Verarmung") bleibt der Gehalt an unlöslichem Coenzym A

etwa konstant, während der Gehalt an löslichem Coenzym A in 24 h etwa auf das o,8-fache abnimmt. Die Hefe wurde mit Lösungen verschiedener Substrate inkubiert und die Bedingungen für eine optimale Anreicherung mit langkettigen Acyl-Coenzym A-Verbindungen herausgefunden (12 h Inkubation in 1 Volumen-% Äthanol bei 3o°C); der Anreicherungsfaktor schwankt zwischen 2 und 6. Unter diesen Bedingungen beträgt die Atmungsrate o,67 µMol O_2 pro h und pro mg Feuchtgewicht Hefe; das Molverhältnis O_2/Äthanol liegt bei 1,7o ± o,o6.

4) Die Extraktion von langkettigen Acyl-Coenzym A-Verbindungen aus biologischem Material sowie die Mitextraktion von Verunreinigungen, insbesondere Lipiden, wird eingehend untersucht. Es werden verschiedene Methoden zur partiellen Reinigung der erhaltenen Extrakte angegeben, darunter präparative dünnschicht- und säulenchromatographische Verfahren, differentielle Extraktion mit verschiedenen nacheinander angewandten Lösungsmitteln sowie eine enzymatische Vorreinigung mit Phospholipase C.

Die langkettigen Acyl-Coenzym A-Fraktionen aus Hefe und Leber werden isoliert und nach Umwandlung in die Fettsäuremethylester gaschromatographisch charakterisiert. Die relativen Anteile der verschiedenen Fettsäurereste werden mit den entsprechenden Anteilen in der Fraktion der freien Fettsäuren aus Schweineleber und mit Literaturwerten für die Zusammensetzung mehrerer Lipidspezies verglichen. Unter anderem wird das Vorkommen von Pentadecyl- und Margaryl-Coenzym A in dem vom Sumper'schen Kettenabbruchmodell vorausgesagten Verhältnis bewiesen, bei den mehrfach ungesättigten Säuren ein Gehalt an Eicosatrien(5,8,11)yl-Coenzym A wahrscheinlich gemacht. Ebenfalls im Einklang mit der Voraussage steht ein Absinken des Verhältnisses von C_{18}- zu C_{16}-Säuren in Rattenleber während des Fastens.

8. Literaturverzeichnis

1 F.Lynen (1960) Sitzungsber.d.Bayer.Akad.d.Wiss.,Math.-Nat. Klasse, S.8-10

2 F.Lynen (1961) Fed.Proc. 20, 941-951

3 F.Lynen (1967) Biochem.J. 102, 381-400

4 D.N.Burton, A.G.Haavik, J.W.Porter (1968) Arch.Biochem. Biophys. 126, 141-154

5 M.D.Lane, J.Moss, S.E.Polakis (1974) Current Topics in Cellular Regulation 8, 139-196

6 J.Spieß (1976) Diss.Univ.München

7 M.Mishina, T.Kamiryo, A.Tanaka, S.Fukui, S.Numa (1976) Eur.J.Biochem. 71, 295-300

8 G.Henniger, S.Numa (1972) Hoppe-Seylers' Z.physiol.Chem. 353, 459-462

9 T.Tanabe, K.Wada, T.Okazaki, S.Numa (1975) Eur.J.Biochem. 57, 15-24

10 F.Wieland (1978) Diss.Univ.München

11 J.K.Stoops, M.J.Arslanian, Y.H.Oh, K.C.Aune, T.C.Vanaman, S.J.Wakil (1975) PNAS USA 72, 1940-1944

12 I.-C.Kim, C.J.Unkefer,W.C.Deal jr.(1977) Arch.Biochem.Biophys. 178, 475-485

13 J.Yourno, T.Kohno, J.R.Roth (1970) Nature 228, 820-824

14 H.-C.Chang, I.Seidman, G.Teebor, M.D.Lane (1967) Biochem. Biophys.Res.Comm. 28, 682

15 C.Gregolin, E.Ryder, R.C.Warner, A.K.Kleinschmidt, M.D.Lane (1966) PNAS USA 56, 1751-1758

16 W.M.Bortz, F.Lynen (1963) Biochem.Z. 337, 505-509

17 W.M.Bortz, F.Lynen (1963) Biochem.Z. 339, 77-82

18 F.Lynen (1964) in New Perspectives in Biology (M.Sela ed.), B.B.A.Library vol.4, 132-146

19 S.Numa, W.M.Bortz, F.Lynen (1965) in Advances in Enzyme Regulation (G.Weber ed.) vol.3, 407, Pergamon Press, London

20 S.Numa, E.Ringelmann, F.Lynen (1965) Biochem.Z. 343, 243-257

21 A.G.Goodridge (1972) J.Biol.Chem. 247, 6946-6952

22 A.P.Halestrap, R.M.Denton (1974) Biochem.J. 142, 365-377

23 H.Ogiwara, T.Tanabe, J.Nikawa, S.Numa (1978) Eur.J.Biochem. 89, 33-41

24 W.L.Zahler, R.E.Barden, W.W.Cleland (1967) Fed.Proc. 26, 672

25 G.Lust, F.Lynen (1968) Eur.J.Biochem. 7, 68-72

26 R.R.Guchhait, S.Mukherje (1972) Indian J.Biochem. 9, 271-272

27 M.Sumper (1974) Eur.J.Biochem. 49, 469-475

28 J.Ganguly (1960) Biochim.Biophys.Acta 40, 110-118

29 S.Numa, M.Matsuhashi, F.Lynen (1962) Fed.Proc.21, 288

30 F.Lynen (1967) Progr.Biochem.Pharmacol. 3, 1

31 T.Kamiryo, S.Parthasarathy, S.Numa (1976) PNAS USA 73,386-390

32 P.Overath, G.Pauli, H.V.Schairer (1969)Eur.J.Biochem.7,559-574

33 E.A.Siess, D.G.Brocks, O.H.Wieland (1976) FEBS Letters 69, 265-271

34 W.Pirson (1970) Diss.Univ.München

35 W.Pirson, F.Lynen (1971) Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem. 352, 797-804

36 S.A.Margolis, H.Baum (1966) Arch.Biochem.Biophys. 114,445-451

37 R.D.Yates, J.A.Higgins, R.J.Barrnett (1969) J.Histochem. Cytochem. 17, 379

38 P.F.Zuurendonk, J.M.Tager (1974) Biochim.Biophys.Acta 333, 393-399

39 T.Kamiryo, M.Mishina, S.Tashiro, S.Numa (1977) PNAS USA 74, 4947-4950

40 M.Mishina, T.Kamiryo, S.Tashiro, T.Hagihara, A.Tanaka, S.Fukui, M.Osumi, S.Numa (1978) Eur.J.Biochem. 89, 321-328

41 G.B.Ansell, R.M.C.Dawson, J.N.Hawthorne (1973) Form and Function of Phospholipids, B.B.A.Library vol.3, Elsevier, Amsterdam-London-New York

42 S.Yamashita, S.Numa (1972) Eur.J.Biochem.31,565-573

43 S.Yamashita, K.Hosaka, S.Numa (1973) Eur.J.Biochem.38, 25-31

44 S.Yamashita, N.Nakaya, Y.Miki, S.Numa (1975) PNAS USA 72,600-603

45 K.Hosaka, U.Schiele, S.Numa (1977) Eur.J.Biochem. 76, 113-118

46 L.Jaenicke, F.Lynen (1960) in The Enzymes (P.D.Boyer, H.Lardy, K.Myrbäck eds.) 3, 3-104, Acad.Press, New York & London

47 W.W.Cleland (1964) Biochem. 3, 480-482

48 G.Michal, H.-U.Bergmeyer (1963) Biochim.Biophys.Acta 67,599-616

49 J.B.Allred, D.G.Guy (1969) Anal.Biochem. 29, 293-299

50 P.K.Tubbs, P.B.Garland in Methods in Enzymology (J.M.Lowenstein ed.) 13 (1969), 535-551, Acad.Press, New York & London

51 G.Michal (1968) Fresenius' Z.f.anal.Chem. 243, 649-656

52 D.J.Pearson, P.K.Tubbs (1967) Biochem.J.105, 953-963

53 S.J.Wakil, G.Hübscher (1960) J.Biol.Chem.235, 1554-1558

54 P.B.Garland (1964) Biochem.J. 92, 10c-12c

55 P.A.Srere (1959) J.Biol.Chem. 234, 2544-2547

56 P.A.Srere (1961) J.Biol.Chem. 236, 50-53

57 K.Decker (1955) Diss.Univ.München

58 E.R.Stadtman (1953) J.Cell.Comp.Physiol. 41, 89

59 N.O.Kaplan, F.Lipmann (1948) J.Biol.Chem. 174, 37-44

60 H.Chantrenne,F.Lipmann (1950) J.Biol.Chem. 187, 757-767

61 F.Lynen,E.Reichert, L.Rueff (1951) Annalen 574, 1-32

62 H.Tabor, A.H.Mehler, E.R.Stadtman (1953) J.Biol.Chem.204,127-138

63 R.W.von Korff (1953) J.Biol.Chem.200, 401-405

64 G.D.Novelli (1957) in Methods in Enzymology (S.P.Colowick, N.O.Kaplan eds.) 3, 916, Acad.Press, New York

65 E.R.Stadtman, G.D.Novelli, F.Lipmann (1951) J.Biol.Chem. 191, 365-376

66 E.R.Stadtman (1955) in Methods in Enzymology (S.P.Colowick, N.O.Kaplan eds.) 1, 596-599, Acad.Press, New York

67 G.Michal, H.-U.Bergmeyer (1974) in Methoden der enzymatischen Analyse, 3.Auflage (H.-U.Bergmeyer ed.) II, 2o2o-2o29, Verlag Chemie, Weinheim an der Bergstraße

68 K.-I.Arnstadt (1974), persönliche Mitteilung

69 P-L Biochemicals (197o) Firmenschrift

7o E.R.Stadtman (1957) in Methods in Enzymology 3, 228-231

71 F.Lipmann, L.C.Tuttle (1945) J.Biol.Chem. 159, 21-28

72 K.Decker (1959) Die aktivierte Essigsäure

73 E.R.Holiday, E.A.Johnson (1949) Nature 163, 216

74 R.R.Grunert, D.H.Phillips (1951) Arch.Biochem.Biophys.3o,217-225

75 G.L.Ellman (1959) Arch.Biochem.Biophys. 82, 7o

76 W.L.Zahler, R.E.Barden, W.W.Cleland (1968) Biochim.Biophys. Acta 164, 1-11

77 S.S.Kuwahara (197o) Org.Prep.Proc. 2, 45-5o

78 R.E.Barden, W.W.Cleland (1969) Biochem.Biophys.Res.Comm. 34, 555-559

79 P.K.Tubbs, P.B.Garland (1964) Biochem.J. 93, 55o-557

8o J.Schultz (1968) Diss.Univ.München

81 J.W.Porter, R.W.Long (1958) J.Biol.Chem. 233, 2o

82 R. Bressler, S.Wakil (1961) J.Biol.Chem. 236, 1643

84 H.K.Shapiro, D.J.Prescott (1978) J.Chrom.154, 353-355

85 W.Colli, P.C.Hinkle, M.E.Pullman (1969) J.Biol.Chem.244,6432-644

86 J.Ayling, R.Pirson, F.Lynen (1972) Biochem. 11, 526-532

87 M.E.Pullman (1973) Anal.Biochem. 54, 188-198

88 K.Christiansen (1975) Anal.Biochem. 66, 93-99

89 T.Schreckenbach (1975) Diss.Univ.München

9o S.S.Hanes, F.A.Isherwood (1949) Nature 164, 11o7

91 Amersham-Buchler (1972) Firmenschrift, Rev.14, The radio-chromatography of labelled compounds

92 G.Rouser (1973) J.Chromatogr.Sci. 11, 6o-76

93 O.Wieland, L.Weiss (196o) Proc.IV.Intern.Congr.Biochem. Vienna 15, 158

94 S.Kumar, J.A.Dorsey, R.A.Muesing, J.W.Porter (197o) J.Biol. Chem. 245, 4732-4744

95 D.Veloso, R.L.Veech (1974) Anal.Biochem. 62, 449-46o

96 E.M.Barnes, S.Wakil (1968) J.Biol.Chem. 243, 2955-2962

97 E.M.Barnes, A.C.Swindell, S.J.Wakil (197o) J.Biol.Chem. 245, 3122-3128

98 E.D.Barber, W.E.M.Lands (1971) Biochim.Biophys.Acta 25o,361-366

99 J.F.A.Chase (1967) Biochem.J. 1o4, 51o

1oo M.M.Rapoport, N.Alonzo (1955) J.Biol.Chem. 217, 199

1o1 I.S.Rosenfeld, G.D'Agnolo, P.R.Vagelos (1975) Anal.Biochem. 64, 221-228

1o2 F.Lynen (1951) Annalen 574, 33-37

1o3 G.Toennies, J.J.Kolb (1951) Anal.Chem.23, 823-827

1o4 E.R.Stadtman (1951) J.Biol.Chem. 196, 535-546

1o5 W.Seubert (196o) Biochem.Prep. 7, 8o-83

1o6 A.Al-Arif, M.Blecher (1969) J.Lipid Res. 1o, 344-345

1o7 T.Galliard, P.K.Stumpf (1968) Biochem.Prep. 12, 66-69

1o8 R.J.Banis, C.S.Roberts, G.B.Stokes, S.B.Tove (1976) Anal. Biochem. 73, 1-8

1o9 U.Weithmann (1974) Diss.Univ.München

11o M.Mancha, G.B.Stokes, P.K.Stumpf (1975) Anal.Biochem.68,6oo-6o8

111 V.P.Dole (196o) J.Biol.Chem. 235, 2595

112 J.Folch, M.Lees, G.H.Sloane-Stanley (1957) J.Biol.Chem. 226, 497-5o9

113 R.C.MacDonald, S.P.Rempas (1977) J.Chrom. 131, 157-168

114 E.Sánchez de Jiménez, W.W.Cleland (1969) Biochim.Biophys. Acta 176, 685-691

115 S.S.Kuwahara (197o) Org.Prep.Proc. 2, 45-5o

116 J.P.Williams, P.A.Merrilees (197o) Lipids 5, 367-37o

117 G.V.Marinetti (1976) Lipid Chromatographic Analysis, vol.1, Marcel Dekker, New York & Basel

118 E.E.Hill, D.R.Husbands, W.E.M.Lands (1968)J.Biol.Chem.243,444o-4451

119 Y.S.Shin (1962) Anal.Chem. 34, 1164

12o K.L.Hsu, G.L.Powell (1975) PNAS USA 72, 4729-4733

121 G.L.Powell, J.E.Churchich (1978) Biochem.Biophys.Res.Comm. 85, 927-933

122 R.E.Barden, W.W.Cleland (1969) J.Biol.Chem.244 (1969),3677-3684

123 M.Dixon, E.C.Webb (196o) Enzymes, Longmans, Green & Co.Ltd., London

124 P.Becher (1962) J.Phys.Chem. 66, 374-375

125 P.R.Vagelos, W.van den Heuvel, M.Horning (1961) Anal.Biochem. 2, 5o

126 E.Barron, L.Mooney (1968) Anal.Chem. 4o, 1742

127 A.R.Johnson, J.B.Davenport (1971) Biochemistry and Methodology of Lipids, Wiley-Interscience, New York-London-Sydney-Toronto

128 H.J.Seitz, R.P.Faupel, S.C.Kampf, W.Tarnowski (1973) Arch. Biochem.Biophys. 158, 12-18

129 J.Siedel (1976) Diss.Univ.München

130 G.Rouser, G.Simon, G.Kritchevsky (1969) Lipids 4,599-606

131 A.Kornberg, W.E.Pricer (1953) J.Biol.Chem. 204,329

132 D.K.Bloomfield,K.Bloch (1960) J.Biol.Chem. 235, 337-345

133 R.M.Denton, M.L.Halperin (1968) Biochem.J.110, 27-38

134 R.P.Faupel, H.J.Seitz, W.Tarnowski, V.Thiemann, C.Weiss (1972) Arch.Biochem.Biophys. 148, 509-522

135 O.Wieland, L.Weiss (1965) Klin.Wschr. 43, 645

136 G.Michal, H.-U.Bergmeyer, K.Decker, P.B.Garland, W.Schoner, W.Seubert (1970) Meth.d.enz.Anal.2, 1892-1934

137 F.Lynen (1942) Annalen 552, 270

138 O.Warburg (1974) Meth.d.enz.Anal.1, 263-270

139 N.S.Radin (1969) Methods in Enz. 14, 245-254

140 K.S.Bjerve, L.N.W.Daae, J.Bremer (1974) Anal.Biochem.58, 238-245

141 M.A.B.Maxwell, J.P.Williams (1967) J.Chrom. 31, 62-68

142 D.Eberhagen (1962) J.Lipid Res. 3, 382

143 R.Letters (1966) Biochim.Biophys.Acta 116, 489-499

144 C.C.Sweeley (1969) Methods in Enz. 14, 254-267

145 L.M.Smith, N.K.Freeman (1959) J.Dairy Sci. 42, 1950

146 E.Klenk, E.U.Schorsch (1967) Hoppe-Seyler's Z.f.physiol. Chemie 348, 1061

147 T.Shimojo, A.Yokoyama, K.Ohno (1962) J.Biochem.(Tokyo)51,293

148 T.Shimojo, H.Kanoh, K.Ohno (1971) J.Biochem.(Tokyo) 69,255

149 F.D.Collins, V.L.Shotlander (1960) J.Lipid Res.1, 352

150 Merck (1977) Firmenschrift, Extrelut: Neues Verfahren zur Extraktion lipophiler Stoffe

151 E.Mehl, H.Jatzkewitz (1963) Naturwissenschaften 50, 227

152 C.L.Tipton, J.W.Paulis, M.D.Pierson (1964) J.Chrom.14,486

153 E.Romanowska (1970) Anal.Biochem.33, 383

154 J.Ellingboe, E.Nyström, J.Sjövall (1969) Methods in Enz.14,317

155 W.K.Downey, R.F.Murphy, M.K.Keogh (1970) J.Chrom. 46, 120

156 G.V.Kisselev (1969) Biokhimiya 34, 483

157 E.G.Trams, C.J.Lauter (1962) Biochim.Biophys.Acta 60,350

158 L.S.Wolfe, J.A.Lowden (1964) Can.J.Biochem.42,1041

159 G.Simon, G.Rouser (1969) Lipids 4, 607-614

160 J.C.Dittmer, R.L.Lester (1969) J.Chrom. 43, 512-514

161 B.Almé, E.Nyström (1971) J.Chrom. 59, 45

162 E.C.Robles, G.F.M.Roels (1971) Chem.Phys.Lipids 6, 31

163 G.J.Nelson, N.K.Freeman (1960) J.Biol.Chem. 235, 578

164 J.Clausen, K.C.Srivastava (1972) Lipids 7, 415

165 L.Hausheer, W.Pedersen, K.Bernhard (1963) Helv.Chim.Acta 46,601

166 P.Overath, H.Träuble (1973) Biochem.12, 2625

167 O.Renkonen (1963) Acta Chem. Scand. 17, 1925

168 R.D.Weenink, A.P.Tulloch (1966) J.Amer.Oil Chem.Soc.43, 327

169 J.-C.Montet, J.Amic, J.Hauton (197o) Bull.Soc.Chim.Biol. 52, 831-84o

170 K.Kiuchi, T.Ohta, H.Ebine (1977) J.Chromatog.133, 226-23o

171 G.Schettler (1967) Lipids and Lipidoses, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York

172 MA.Lunzer,J.A.Manning.R.K.Ockner(1977)J.Biol.Chem.252,5483-5487

173 R.G.Ackman (1969) Methods in Enz.14, 329-381

174 M.K.Wassef (1977) Adv.Lipid Res.15, 159-232

175 H.Brockerhoff (1966)Comp.Biochem.Physiol.19, 1-12

176 M.Sumper, D.Oesterhelt, C.Riepertinger, F.Lynen (1969) Eur.J.Biochem. 1o, 377-387

177 D.K.Bloomfield, K.Bloch (196o) J.Biol.Chem. 235, 337-345

178 W.Stoffel (1966) Naturwissenschaften 53, 621-63o

179 W.Seubert (197o) Naturwissenschaften 57, 443-449

18o Organikum, 12.Aufl. (1973) VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften

181 G.Beisenherz, H.J.Boltze, T.Bücher, R.Czok, K.H.Garbade, E.Meyer-Arendt, G.Pfleiderer (1953) Z.Naturf. 8b,555-577

182 A.Bansadoun, D.Weinstein (1976) Anal.Biochem.7o,241-25o

183 H.H.Hess, M.B.Lees, J.E.Derr (1978) Anal.Biochem.85,295-3oo

184 O.Warburg, W.Christian (1942) Biochem.Z.31o, 384-421

185 E.Layne (1957) Methods in Enz. 3, 447

186 Merck (1976) Firmenschrift, Dyeing Reagents for Thin Layer and Paper Chromatography

187 J.Ziegenhorn (197o) Diss.Univ.München

188 M.Caffrey, J.E.Kinselia (1975) Int.J.Biochem. 6,877-883

189 C.M.Nepokroeff, M.R.Lakshmanan, J.W.Porter (1975) Methods in Enz. 35, 37-44

19o F.Lynen (1969) Methods in Enz. 14, 17-33

191 K.Decker (1974) in Methoden der enzymatischen Analyse (H.-U. Bergmeyer ed.), 3.Aufl., II, 2o37-2o42, Verlag Chemie, Weinheim an der Bergstraße

192 H.Eggerer, F.Lynen (1962) Biochem.Z. 335, 54o-547

193 D.Oesterhelt (1967) Diss.Univ.München

194 L.Gattermann, H.Wieland (1962) Die Praxis des organischen Chemikers, Walter de Gruyter & Co., Berlin

195 H.Schlenk, J.L.Gellerman (196o) Anal.Chem.32, 1412

196 K.Sandhoff (1975) Vorschriften für das Lipid-Blockpraktikum, Univ.München

197 E.Bernt, I.Gutmann (197o) Methoden der enzymatischen Analyse (H.-U.Bergmeyer ed.) II, 1457-146o, Verlag Chemie, Weinheim an der Bergstraße

198 Th.Bücher, H.Redetzki (1951) Klin.Wschr. 29, 615

199 W.W.Umbreit,R.H.Burris,J.F.Stauffer(1974)Manometric Techniques and Tissue Metabolism, Burgess Publ.Co., Minneapolis

2oo S.Numa, M.Matsuhashi, F.Lynen (1961) Biochem.Z.334, 2o3-217

2o1 J.W.Porter, A.Tietz (1957) Biochim.Biophys.Acta 25, 41

2o2 T.K.Ray, J.E.Cronan (1976) PNAS USA 73, 4374-4378

2o3 R.Sundler,B.Åkesson,A.Nilsson (1974) J.Biol.Chem.249,51o2-51o7

2o4 R.Sundler,B.Åkesson (1975) J.Biol.Chem. 25o, 3359-3367

2o5 H.J.Morowitz,T.M.Terry(1969) Biochim.Biophys,Acta 183,276-294

2o6 M.Mishina, M.Isurugi, A.Tanaka, S.Fukui (1977) Agr.Biol. Chem. 41, 517-52o

2o7 B.W.Volk, L.Schneck (1975) The Gangliosides, Plenum, New York

2o8 G.F.Ames (1968) J.Bacteriol. 95, 833-843

2o9 J.A.Dorsey, J.W.Porter (1968) J.Biol.Chem. 243, 3512

21o O.Wieland, G.Löffler, L.Weiss, I.Neufeldt (196o) Biochem.Z. 333, 1o

211 C.H.Fiske, Y.SubbaRow (1925) J.Biol.Chem. 66, 375

212 G.R.Bartlett (1959) J.Biol.Chem. 234, 466-469

213 The Yeasts(1969) (A.H.Roser,J.S.Harrison,eds.),Acad.Press London

214 J.B.M.Rattray, A.Schibeci, D.K.Kidby (1975) Bact.Rev.39,197-231

215 G.Rouser, S.Fleischer (1967) Methods in Enz. 1o, 385-466

216 K.Randerath (1962) Dünnschichtchromatographie, Verlag Chemie, Weinheim an der Bergstraße

217 E.Stahl (1967) Dünnschichtchromatographie,Springer, Berlin

218 W.P. Skipski, M.Barclay (1969) Methods in Enz. 14, 53o-598

219 D.L.Young, F.Lynen (1969) J.Biol.Chem.244, 377-383

22o J.Schultz, F.Lynen (1971) Eur.J.Biochem. 21, 48-54

221 M.Ishida-Ichimasa, Y.Ichimasa, K.Uranaka (1976) Agr.Biol. Chem. 4o, 1253-1254

222 S.Guðbjarnason, G.Oskarsdóttir (1977) Biochim.Biophys.Acta 487, 1o-15

223 E.Klenk, W.Gielen (1961) Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem. 326, 144

224 H.Wagner, L.Hörhammer, P.Wolff (1961) Biochem.Z.334,175-184

225 B.W.Nichols (1963) Biochim.Biophys.Acta 7o, 417-422

226 P.P.M.Bonsen, G.H.deHaas, L.L.M.van Deenen (1965) Biochim. Biophys.Acta 1o6, 93-1o5

Lebenslauf

Ich wurde am 28.September 1950 in Neuburg an der Donau geboren. Meine Eltern sind der Kaufmann und Klavierbauer Wilhelm Olbrich und seine Frau Ilse, geb. Kastner.

1956 - 1960	Katholische Knabenvolksschule, Neuburg an der Donau
1960 - 1969	Descartes-Gymnasium Neuburg an der Donau, Mathematisch-naturwissenschaftlicher Zweig
Juni 1969	Reifeprüfung
Oktober 1969	Beginn des Chemiestudiums an der Ludwig-Maximilians-Universität München
März 1971	Diplom-Vorprüfung
Oktober 1973	Diplom-Hauptprüfung
Januar 1974 - April 1979	Anfertigung der Diplom- und Doktorarbeit am Institut für Biochemie der Universität München unter Anleitung von Prof.Dr.F.Lynen
seit Februar 1978	Verwalter der Dienstgeschäfte eines wissenschaftlichen Assistenten
Juli 1978	Eheschließung mit Rebekka Magnúsdóttir aus Reykjavík (Island)